

# **Expressionsanalysen geprägter Gene in der Prader-Willi/Angelman-Syndrom-Region**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs  
Biologie und Geographie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**Michaela Wawrzik**

aus Witten

Oktober 2009

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. G Ryffel

3. Gutachter: /

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2010

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Buiting K, Nazlican H, Galetzka D, **Wawrzik M**, Gross S, Horsthemke B (2007) *C15orf2* and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics* **89**: 588-95

**Wawrzik M**, Spiess AN, Herrmann R, Buiting K, Horsthemke B (2009) Expression of *SNURF-SNRPN* upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. *Eur J Hum Genet* **17**: 1463-70

**Wawrzik M**, Unmehopa UA, Swaab DF, van de Nes JA, Buiting K, Horsthemke B (2009) The *C15orf2* gene in the Prader-Willi syndrome region is subject to genomic imprinting and positive selection. *Neurogenetics*, epub ahead of print December 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Genomisches Imprinting	1
1.2	Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom	7
1.2.1	Molekulargenetische Ursachen des Prader-Willi- und des Angelman-Syndroms	8
1.2.2	Die Gene der PWS/AS-Region	13
1.3	Zielsetzung	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Lösungen	19
2.1.2	Standardlösungen	19
2.1.3	Medien	20
2.1.3.1	Medien für die Kultur von Bakterien	20
2.1.3.2	Medien für die Kultur von Zellen	20
2.1.4	Bakterienstämme und Zelllinien	21
2.1.4.1	Bakterienstamm	21
2.1.4.2	Zelllinien	21
2.1.5	Plasmide	21
2.1.6	Größenstandards	21
2.1.7	Oligonukleotide	22
2.1.8	Enzyme	22
2.1.9	Antikörper	22
2.1.10	cDNA	23
2.1.11	RNA	23
2.1.12	Patienten	23
2.1.13	Gewebe	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Arbeiten mit DNA	24
2.2.1.1	Isolierung von DNA aus peripherem Blut	24
2.2.1.2	Präparation von Plasmid-DNA	25
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.1.4	Fragmentlängenanalyse	26
2.2.1.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	26
2.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.1.7	Elution von DNA aus Agarosegelen	27
2.2.1.8	Konzentrationsbestimmung von DNA	27
2.2.1.9	Sequenzierung von DNA	28
2.2.1.10	Restriktionsendonukleaseverdau	28
2.2.1.11	Ligation	29
2.2.1.12	Bisulfitbehandlung von DNA	29
2.2.1.13	TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping Assays	30

2.2.2	Arbeiten mit RNA	30
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von RNA	30
2.2.2.2	DNase I-Behandlung von RNA	31
2.2.2.3	Reverse Transkription von cDNA (RT-PCR)	31
2.2.2.4	Allelspezifische Genexpressionsanalyse	31
2.2.2.5	Amplifikation von cDNA-Enden (5'RACE)	32
2.2.3	Bakterien	32
2.2.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien	32
2.2.3.2	Transformation kompetenter Bakterien	33
2.2.4	Zellkultur	33
2.2.4.1	Kultivierung der Zellen	33
2.2.4.2	Passagieren von Zellen	33
2.2.4.3	Transiente Transfektion von Zellen	34
2.2.4.4	Immunfluoreszenz	34
2.2.5	Arbeiten mit Proteinen	35
2.2.5.1	Gesamtproteinextraktion aus Zellen	35
2.2.5.2	Gesamtproteinextraktion aus Gewebe	35
2.2.5.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung	36
2.2.5.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.5.5	Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot)	37
2.2.6	Statistische Analyse	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Expressions- und Methylierungsanalysen in der PWS-kritischen Genregion sowie epigenetisch relevanter Gene	40
3.1.1	<i>PWRN1</i> ist Teil der <i>IC-SNURF-SNRPN</i> -Transkriptionseinheit	40
3.1.2	<i>PWRN1</i> wird in fetalem Gehirn paternal exprimiert	42
3.1.3	Expressionsprofile der <i>IC-SNURF-SNRPN</i> -Transkriptionseinheit und weiterer epigenetisch relevanter Gene in verschiedenen Stadien der Spermatogenese	43
3.1.4	Analyse der mRNA BC035402	49
3.1.5	Methylierungsanalysen neu identifizierter CpG-Islands innerhalb der <i>IC-SNURF-SNRPN</i> -Transkriptionseinheit	50
3.1.5.1	Methylierungsstatus des CpG40	51
3.1.5.2	Methylierungsstatus des CpG30	53
3.1.5.3	Methylierungsstatus des CpG37	55
3.2	Weiterführende Analysen des Gens <i>C15orf2</i> der PWS/AS-Genregion	57
3.2.1	Methylierungsanalyse von <i>C15orf2</i>	57
3.2.2	Expressionsanalysen des <i>C15orf2</i> -Gens	60
3.2.2.1	Expressionsanalyse des <i>C15orf2</i> -Gens in verschiedenen Geweben	60
3.2.2.2	<i>C15orf2</i> wird in fetalem Gehirn vom paternalen Chromosom exprimiert	61
3.2.2.3	Nachweis des endogenen <i>C15orf2</i> -Proteins	62
3.2.2.4	Intrazelluläre Lokalisation von <i>C15orf2</i>	68
3.2.3	Sequenzvarianten und Haplotypen von <i>C15orf2</i>	70
3.2.3.1	Analyse der Haplotypstruktur von <i>C15orf2</i>	70
3.2.3.1	Ermittlung von komplexen Haplotypen von <i>C15orf2</i>	71

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1	<i>PWRN1</i> ist Teil der <i>IC-SNURF-SNRPN</i> -Transkriptionseinheit und wird paternal exprimiert	74
4.2	Die Transkripte der <i>IC-SNURF-SNRPN</i> -Transkriptionseinheit und weiterer epigenetisch relevanter Gene werden in bestimmten Stadien der männlichen Keimbahn spezifisch exprimiert	75
4.3	Drei neu identifizierte CpG-Islands in der Region der <i>SNURF-SNRPN</i> -Upstream Exons zeigen eine allelspezifische Methylierung	80
4.4	Evolutionenbiologische Aspekte und Expressionsanalysen von <i>C15orf2</i>	81
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>103</b>
7.1	Oligonukleotide (Primer)	103
7.2	Sonden für die SNP-Genotypisierung durch TaqMan Genotyping Assays (Applied Biosystems)	105
7.3	Rohdaten der <i>C15orf2</i> -Haplotypanalyse	106

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
aa	<i>amino acid</i> ; Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Angelman-Syndrom
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
del	Deletion
DMR	differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed sequence tags (cDNA Nukleotidsequenzen)
FCS	<i>Fetal-Calf-Serum</i> ; fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IC	Imprinting Center
ID	Imprinting Defekt
Imprinting	Prägung (elternspezifische Genexpression)
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Broth Base-Medium
M	mol/l
mat	maternal
Mb	Megabasenpaar
min	Minute
ml	Milliliter
MS-PCR	Methylierungsspezifische PCR
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
n x g	n-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
NaOH	Natronlauge
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , USA ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )
NP	Normalperson
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
p	<i>petit</i> ; kurzer Arm eines Chromosoms
P	<i>probability</i> ; Wahrscheinlichkeit

pat	paternal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PWS	Prader-Willi-Syndrom
PWS-ID	PWS Patient mit einem Imprinting Defekt
q	<i>queue</i> ; langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i> ; kleine nukleoläre RNA
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelbasenaustausch
SRO	<i>smallest region of deletion overlap</i> , kleinster überlappender Deletionsbereich
STR	<i>short tandem repeat</i> , Nukleotidwiederholungssequenzen
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UPD	uniparentale Disomie
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
Ø	Querschnitt



# 1. Einleitung

## 1.1 Genomisches Imprinting

In den frühen 1980er Jahren wurde das sogenannte genomische Imprinting entdeckt. Dies bezeichnet das Phänomen, dass in einem Individuum das maternale und das paternale Genom funktionell nicht äquivalent sind. Bestimmte Chromosomenabschnitte werden während der Entwicklung in der elterlichen Keimbahn spezifisch modifiziert, so dass als Resultat in den somatischen Zellen nur das maternale oder das paternale Allel eines Gens aktiv ist (Reik, 1989; Reik und Surani, 1997; Reik und Walter, 2001). Entdeckt wurde dieser Vorgang durch Transplantationsexperimente mit Vorkernen von Mauseizygoten, bei denen gezeigt werden konnte, dass für die normale Embryonalentwicklung sowohl ein maternales als auch ein paternales Genom notwendig ist (McGrath und Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984). Bei dem Austausch des männlichen Pronucleus mit einem weiblichen erhält man einen Gynogenoten, der einen diploiden maternalen Chromosomensatz enthält. In diesem Falle wird zwar ein Embryo gebildet, jedoch ist das extraembryonale Gewebe (Trophoblast) nahezu nicht vorhanden. Dagegen zeigt der Embryo im Falle eines Androgenoten, der einen diploiden paternalen Chromosomensatz enthält, schwere Entwicklungsstörungen und stirbt in der ersten Hälfte der Entwicklung ab. Das Trophoblastengewebe ist jedoch stark ausgebildet. Auch beim Menschen treten solche uniparentalen Embryonen auf. In der androgenetischen Form bilden sie eine sogenannte Blasenmole aus, die aus degenerierten Trophoblastenstrukturen besteht, jedoch kein embryonales Gewebe enthält. Aus gynogenetischen Embryonen entwickeln sich Ovarialteratome, die Gewebe aller drei Keimblätter beinhalten, jedoch fehlen jegliche extraembryonale Strukturen (Hall, 1990).

Zunächst wurde gedacht, das Auftreten des genomischen Imprintings sei nur auf Plazentatieren (Eutheria), Beuteltiere (Metatheria) und Blütenpflanzen beschränkt, mittlerweile ist dieses Phänomen jedoch auch im Zebrafisch (Martin und McGowan, 1995), Insekten und *C. elegans* (Bean, *et al.*, 2004) nachgewiesen worden. Die treibende Kraft zur Entstehung der genomischen Prägung ist laut der Geschlechterkonflikthypothese (Moore und Haig, 1991; Haig *et al.*, 1997) der genetische Konflikt über die maternalen Ressourcen in der prä- und neonatalen Zeitspanne. Paternal exprimierte Gene tendieren dazu maternale Ressourcen in Anspruch zu nehmen und somit das Wachstum des Feten zu steigern, maternal exprimierte Gene wirken dem entgegen, um Ressourcen für weitere Schwangerschaften zu erhalten. Ein Beispiel für ein solches Expressionsmuster sind die Gene *Igf2* und *Igf2r* in der

Maus. Das paternal exprimierte *Igf2* codiert für einen Wachstumsfaktor (DeChiara *et al.*, 1991), das maternal exprimierte *Igf2r* für ein Protein, welches an der Entfernung von *Igf2* beteiligt ist (Barlow *et al.*, 1991). Unterstützung erhält die Hypothese von der Tatsache, dass Kloakentiere (Monotremata) die einzigen Säugetiere sind, bei denen kein genomisches Imprinting auftritt. Diese bringen eierlegend ihre Nachkommen zur Welt, somit sind die maternalen Ressourcen für den Embryo von vorneherein auf ein bestimmtes Maß beschränkt. Beim Menschen sind mittlerweile mehr als 50 solcher geprägter Gene bekannt (<http://www.mgu.hhar.mrc.ac.uk/research/imprinting/imprin-viewdatagenes.html>, [http:// geneimprint.com/databases/](http://geneimprint.com/databases/)), es wird vermutet, dass insgesamt etwa 100-200 Gene dem Imprinting unterliegen. Die Gene besitzen keine Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Proteinsequenz oder funktioneller Domänen, jedoch ist ein charakteristisches Merkmal, dass sie meist geclustert in chromosomalen Regionen vorliegen (Reik und Maher, 1997; Reik und Walter, 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Gene nicht einzeln, sondern koordinativ in den chromosomalen Domänen reguliert werden. Analog zur Inaktivierung des X-Chromosoms, bei dem ein X-Inaktivierungszentrum (*Xic*) die Inaktivierung des gesamten Chromosoms reguliert, wurden in manchen Clustern sogenannte Imprinting Center (IC) identifiziert, die die Expression der geprägten Gene und die Chromatinstruktur der jeweiligen Region regulieren (Buiting *et al.*, 1995).

Durch Fehlverteilungen der Chromosomen während der Meiose und Mitose kann es dazu kommen, dass in einem Individuum zwei homologe Chromosomen denselben elterlichen Ursprung haben. Diesen Zustand bezeichnet man als uniparentale Disomie (UPD). Aufgrund von spezifischen Phänotypen bei der Maus, die einer uniparentalen Disomie zugrunde liegen, konnten dem genomischen Imprinting unterliegende Chromosomenabschnitte identifiziert werden (Cattanach und Kirk, 1985). So sind z.B. Mausembryonen mit einer maternalen uniparentalen Disomie des Chromosoms 11 (upd(11)mat) kleiner und solche mit einer paternalen uniparentalen Disomie des Chromosoms 11 (upd(11)pat) größer als die Geschwistertiere desselben Wurfs. Dies deutet auf eine elternspezifische Expression bestimmter Gene, entweder vom maternalen oder vom paternalen Chromosom, hin. Bei einer uniparentalen Disomie fehlt die Expression der geprägten Gene, die von dem nicht vorhandenen elterlichen Chromosom exprimiert werden, oder Gene werden in doppelter Dosis exprimiert. Beides kann zu einer Veränderung im Phänotyp führen.

Beim Menschen konnten mittlerweile mehrere Phänotypen identifiziert werden, die sich auf eine uniparentale Disomie zurückführen lassen. Eine paternale UPD 6 (upd(6)pat) führt zu transientem neonatalen Diabetes Mellitus (TNDM) (Temple *et al.*, 1995; Arima *et al.*, 2001)

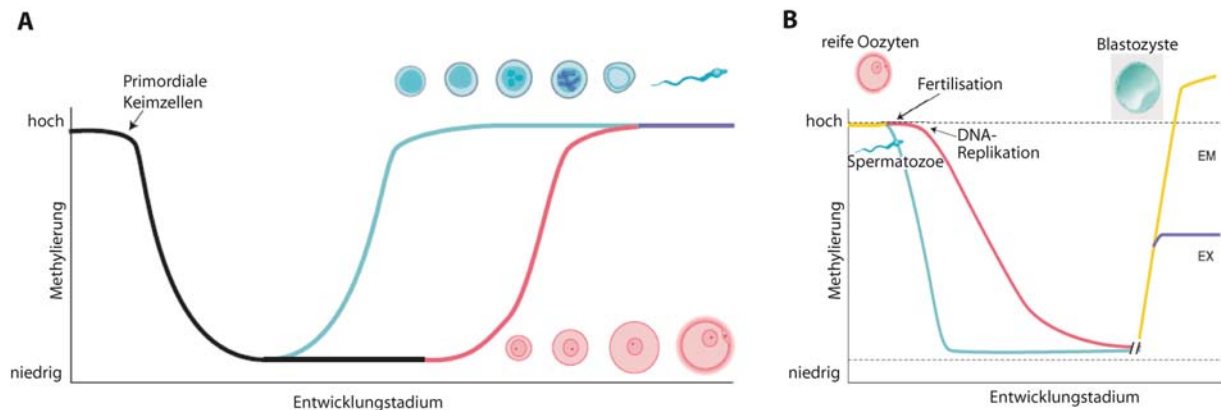
und eine maternale UPD 7 (upd(7)mat) zum Silver-Russell-Syndrom (Kotzot *et al.*, 1995). Eine paternale UPD 11 (upd(11)pat) ist mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom assoziiert (Henry *et al.*, 1991; Slatter *et al.*, 1994; Weksberg *et al.*, 2003). Bei einer maternalen UPD 14 (upd(14)mat) kommt es zu motorischer Entwicklungsverzögerung, Kleinwuchs, milden fazialen Dysmorphien und vorzeitiger Pubertät (Kotzot, 2004), wohingegen eine paternale UPD 14 (upd(14)pat) zu schweren mentalen Retardierungen sowie Muskel- und Skelettauffälligkeiten führt (Cotter *et al.*, 1997; Kurosowa *et al.*, 2002). Eine maternale UPD 15 (upd(15)mat) führt zum Prader-Willi-Syndrom (Nicholls *et al.*, 1989), eine paternale UPD 15 (upd(15)pat) dagegen zum Angelman-Syndrom (Malcolm *et al.*, 1991; Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal geprägter Gene ist neben ihrem elternspezifischen Expressionsmuster ein asynchrones Replikationsverhalten in der S-Phase des Zellzyklus. In den meisten geprägten Regionen replizieren die paternalen Allele früher als die maternalen Allele (Kitsberg *et al.*, 1993; Knoll *et al.*, 1994). Diese asynchrone Replikationszeit ist auf die geprägten Regionen beschränkt, somit scheint sie durch *in cis* wirkende Elemente reguliert zu sein (Greally *et al.*, 1998). Dieses Verhalten ist auch unabhängig von der Genexpression, so dass Gene, die gemeinsam auf einer elterlichen Kopie liegen, gemeinsam repliziert werden, auch wenn die Expression von unterschiedlichen Allelen erfolgt. Dieses asynchrone Replikationsmuster wird in den Gameten etabliert und während der gesamten Entwicklung aufrechterhalten (Simon *et al.*, 1999).

Die Expressionskontrolle geprägter Gene erfolgt durch spezifische Methylierungsmuster der DNA, die sich entsprechend dem elterlichen Ursprung des jeweiligen Gens unterscheiden und bei der Replikation stabil weitergegeben werden. Bei der DNA-Methylierung werden Cytosinbasen in Cytosin-Phospho-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) am 5'-Kohlenstoffatom irreversibel methyliert, so dass 5-Methylcytosin entsteht. Somatische Genome von Vertebraten sind global methyliert, eine Ausnahme bilden jedoch die sogenannten CpG-Islands, Bereiche in denen CpG-Dinukleotide vermehrt auftreten. Diese liegen häufig im 5'-Bereich von Haushaltsgenen und einigen gewebsspezifischen Genen in unmethylierter Form vor.

Als CpG-Islands gelten Regionen, die mindestens 200 bp umfassen und einen GC-Gehalt von über 50% beinhalten. Außerdem muss der Quotient der tatsächlichen CpGs im Vergleich zu den erwarteten CpGs über 0.6 liegen (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). Da jedoch viele *Alu*-Repeats einen erhöhten GC-Gehalt aufweisen, wurden von Takai und Jones (2002) stringendere Bedingungen vorgeschlagen, um eine sichere Unterscheidung zu erreichen.

Die spezifischen Methylierungsmuster der DNA sind während der verschiedenen somatischen Zellentwicklungsstadien relativ stabil, während der frühen Entwicklungsphase kommt es jedoch zu starken Veränderungen in Form einer epigenetischen Reprogrammierung (Razin und Kafri, 1994; Reik *et al.*, 2001; Li, 2002) (Abbildung 1.1). Die Genome der primordialen Keimzellen sind zunächst stark methyliert. Während der Entwicklung kommt es dann zu einer fortschreitenden Demethylierung, die vollständig abgeschlossen ist, wenn die Urkeimzellen bei der Maus am embryonalen Tag 13-14 in die Gonaden gelangen. Es ist bislang noch nicht geklärt, ob dieser Vorgang aktiv oder passiv erfolgt. Während der Differenzierung der Gonaden und der Entwicklung der Keimzellen kommt es zu einer erneuten Methylierung, wobei auch die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Methylierungsmuster etabliert werden. Die Methylierung erfolgt hierbei durch die Methyltransferasen Dnmt3a (Kaneda *et al.*, 2004) und Dnmt3l, wobei Dnmt3l selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, sondern als Regulator sowohl in Oozyten als auch in der Spermatozyten agiert (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002). Diese Reprogrammierung der Methylierung in den Keimzellen ist notwendig für eine Rücksetzung des Imprints. Während der Entwicklung des frühen Embryos kommt es zu einer weiteren Reprogrammierung und *de novo* Methylierung. Noch vor der Einnistung des Embryos, im Morula- und im frühen Blastulastadium, kommt es zu einer erneuten globalen Demethylierung des Genoms, wovon die geprägten Gene jedoch nicht betroffen sind. Dies geschieht sowohl durch passive als auch durch aktive Mechanismen. Das paternale Genom wird aktiv durch einen bislang noch unbekannten Mechanismus demethyliert, wahrscheinlich gekoppelt an eine Remodellierung des Chromatins in der Eizelle (Oswald *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2000). Das maternale Genom wird nach den ersten Zellteilungen durch fehlende Aufrechterhaltung der Methylierung passiv demethyliert (Reik und Walter, 2001). Während des Prä-Gastrula-Stadiums setzt wiederum eine weitgehende *de novo* Methylierung der nicht geprägten Gene ein. Der Umfang unterscheidet sich jedoch zwischen den verschiedenen Zellentwicklungslinien. Somatische Zellen erlangen eine starke Methylierung der DNA, aus Trophoblasten abgeleitete Zelllinien, aus denen z.B. die Plazenta und der Dottersack hervorgehen, zeigen eine geringere Methylierung. Die DNA früher primordialer Keimzellen bleibt zu einem großen Teil unmethyliert. Die Aufrechterhaltung der Methylierung der geprägten Gene erfolgt im Embryo durch die oozytenspezifische Form der Methyltransferase Dnmt1, Dnmt1o (Howell *et al.*, 2001), und wird anschließend durch Dnmt1 aufrechterhalten (Li *et al.*, 1993).



**Abbildung 1.1: Reprogrammierung der Methylierungsmuster in der Keimbahn (A) und im Embryo (B)**

Das paternale Genom ist blau, das maternale Genom rot dargestellt. Geprägte Gene sind durch eine gestrichelte Linie symbolisiert. EM, embryonales Gewebe; EX, extraembryonales Gewebe (nach Reik *et al.*, 2001).

Neben der DNA-Methylierung existieren noch andere wichtige epigenetische Faktoren, wie beispielsweise die Histonmodifikation. Mehrere Mechanismen wie Phosphorylierung, Ubiquitinkonjugation, Methylierung und Acetylierung sind bekannt, wobei die letzten beiden Punkte die wichtigsten darstellen. Bei der Histonacetylierung werden durch verschiedene Histonacetylasen (HATs) Acetylgruppen an Seitenketten von N-terminalen Lysinresten der Histone befestigt, wodurch sich die Affinität zwischen Histonen und DNA verringert und eine offenere Chromatinkonformation entsteht. Dadurch wird die Promotorregion für RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren leichter zugänglich, was sich in einer Aktivierung der Genexpression äußert (Jenuwein und Allis, 2001; Kouzarides, 2007). Der umgekehrte Effekt tritt durch eine Deacetylierung der Histone durch Histondeacetylasen (HDACs) ein. Dieser Vorgang resultiert in einer Repression der Genexpression. Für verschiedene geprägte Regionen konnte bislang gezeigt werden, dass DNA-Methylierung mit einer Hypoacetylierung von Histonen assoziiert ist (Jeppesen und Turner, 1993; Fulmer-Smentek und Francke, 2001; Gregory *et al.*, 2001).

Die Histonacetylierung ist im Gegensatz zur Histonmethylierung weniger stabil, weshalb die Histon-Methylierung als wichtiger für die elternspezifische Expression von Genen erachtet wird. Verschiedene Klassen von Methyltransferasen katalysieren diese Reaktion, bei der N-terminale Arginin- und Lysinreste der Histone durch Anhängen einer Methylgruppe modifiziert werden. Die Methylierung von Argininresten führt hierbei zu einer Aktivierung der Transkription, die Methylierung von Lysinresten kann sowohl zu einer Aktivierung als

auch zu einer Repression der Transkription führen. So ist beispielsweise die Methylierung von Lysin 4 im Histon 3 (H3K4) mit einer aktiven Genexpression assoziiert, während die Methylierung von H3K27 mit einer Repression assoziiert ist.

DNA-Methylierung und Histonmodifikation sind eng miteinander gekoppelt. So binden beispielsweise bestimmte Proteine, sogenannte Methyl-CpG-bindende Proteine (MECPs), spezifisch an methylierte CpG-Sequenzen in Promotoreregionen und bewirken die Repression der entsprechenden Gene. Die Bindung von MECP2 führt zunächst zu einer Aktivierung von Histondeacetylasen, welche die Acetylgruppe von H3K9 entfernen. Dies führt zu einer Methylierung von H3K9, was ein Signal für die Mobilisierung von Proteinen wie HP1 (*heterochromatin protein 1*) ist, welche eine Komprimierung des Chromatins verursachen (Fuks *et al.*, 2003).

Ein weiterer Mechanismus, wie durch DNA-Methylierung die Expression von Genen beeinflusst werden kann, ist, dass die Bindung von Proteinen an spezifische chromosomale Regionen verhindert werden kann. Ein Beispiel hierfür ist die differentielle Expression der Gene *Igf2* und *H19*, welche beide im *Igf2/H19*-Locus auf Chromosom 7 der Maus lokalisiert sind. Eine homologe Region befindet sich beim Menschen auf Chromosom 11. *Igf2* wird vom paternalen Allel exprimiert, *H19* vom maternalen Allel. Reguliert wird dies durch spezifische *Enhancer*-Elemente, die stromabwärts von *H19* lokalisiert sind, sowie durch eine Region zwischen beiden Genen, welche als Imprinting Center (IC) fungiert und auf dem maternalen Chromosom unmethyliert vorliegt, auf dem paternalen Chromosom aber methyliert ist. Diese Region enthält Bindungsstellen für das Protein CTCF (*CCCTC-binding factor*), welches an das unmethylierte IC des maternalen Chromosoms binden kann und einen Chromatin-Isolator bildet. Dies resultiert in einer alleinigen Transkription *H19* vom maternalen Chromosom, da *Igf2* nicht mehr mit den Enhancern interagieren kann. Auf dem paternalen Chromosom kann CTCF nicht an das methylierte IC binden. Deshalb kann *Igf2* mit den Enhancern wechselwirken. Gleichzeitig ist der *H19*-Promotor durch Methylierung stillgelegt. Das bewirkt eine alleinige Expression von *Igf2* vom paternalen Chromosom (Bell *et al.*, 1999; Hark *et al.*, 2000).

## 1.2 Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom

Das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS) sind zwei distinkte neuronale Erkrankungen, die durch einen Funktionsverlust geprägter Gene in der chromosomalen Region 15 q11q13 verursacht werden.

Das Prader-Willi-Syndrom wurde erstmals 1956 von Andreas Prader, Heinrich Willi und Alexis Labhart beschrieben (Prader *et al.*, 1956) und tritt mit einer Inzidenz von 1/15.000-1/25.000 auf. Die klinischen Merkmale eines PWS sind eine neonatale Muskelhypotonie, die eine Fütterungsproblematik und verzögerte Entwicklung bedingt. Im Kleinkindalter kommt es dann aufgrund einer Hyperphagie zu einer ausgeprägten Adipositas. Charakteristische körperliche Merkmale sind Hypogonadismus, Kleinwuchs, Akromikrie und typische faziale Auffälligkeiten wie ein dreieckiger Mund, mandelförmige Augen und eine schmale Stirn. Des Weiteren treten bei den Patienten in der Regel eine moderate mentale Retardierung und psychische Probleme auf. Aufgrund der Symptomatik wird eine Störung im Hypothalamus vermutet (Swaab *et al.*, 1997). Bei einem Teil der PWS-Patienten konnte eine verminderte Wachstumshormonausschüttung festgestellt werden (Lee *et al.*, 1987), die durch eine Gabe von Wachstumshormonen behandelt werden kann. Dies führt zu einer Steigerung der Wachstumsrate und einer positiven Beeinflussung der Körperzusammensetzung in Bezug auf Fett- und Muskelzellen (Angulo *et al.*, 1992; Kamel *et al.*, 1995; Eiholzer *et al.*, 2000; Tauber *et al.*, 2000). Von dieser Behandlung profitieren auch Patienten, die keinen Wachstumshormonmangel haben.

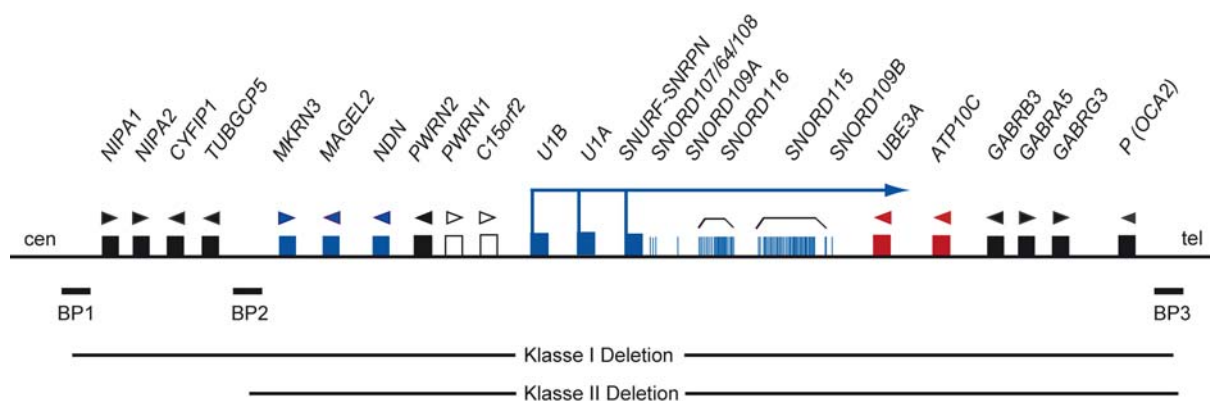
Das Angelman-Syndrom wurde erstmals 1965 von Harry Angelman beschrieben und tritt mit einer Inzidenz von 1/15.000 - 1/20.000 auf. Charakteristische Merkmale sind eine schwere geistige Retardierung, das Fehlen einer aktiven Sprachentwicklung, eine Mikrozephalie, Minderwuchs und eine Ataxie. Des Weiteren kommt es häufig zu epileptischen Anfällen mit charakteristischen Veränderungen des Elektroenzephalogramms (Williams *et al.*, 1995). Die Patienten entwickeln ferner typische Verhaltensauffälligkeiten, wie ausgeprägt freundliches Verhalten mit häufigen Lachanfällen, weswegen dieses Krankheitsbild früher auch als das „happy puppet-Syndrom“ bezeichnet wurde.



**Abbildung 1.2:** Patient mit Prader-Willi-Syndrom (links) und Patient mit Angelman-Syndrom (rechts)

### 1.2.1 Molekulargenetische Ursachen des Prader-Willi- und des Angelman-Syndroms

Es gibt unterschiedliche molekulargenetische Ursachen, die zu einem Funktionsverlust differentiell exprimierter Gene in der PWS/AS-Genregion und so zur Ausprägung eines Prader-Willi- oder Angelman-Syndroms führen können. Bei PWS handelt es sich um den Funktionsverlust paternal exprimierter Gene, während ein Funktionsverlust des maternal exprimierten Gens *UBE3A* zu AS führt (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3:** Schematische Übersicht der chromosomalen Region 15q11q13

Paternal exprimierte Gene sind als blaue Kästchen dargestellt, die *SNORD*-Gene als blaue Striche. Maternal exprimierte Gene sind als rote Kästchen dargestellt, biallelisch exprimierte Gene als schwarze Kästchen. Gene, die monoallelisch exprimiert werden, es jedoch unbekannt ist, ob vom maternalen oder paternalen Allel, sind als weiße Kästchen dargestellt. Pfeilspitzen oberhalb der Gene kennzeichnen die Transkriptionsrichtung. BP, Bruchpunkt; cen, Centromer; tel, Telomer (Abbildung nicht maßstabsgerecht).

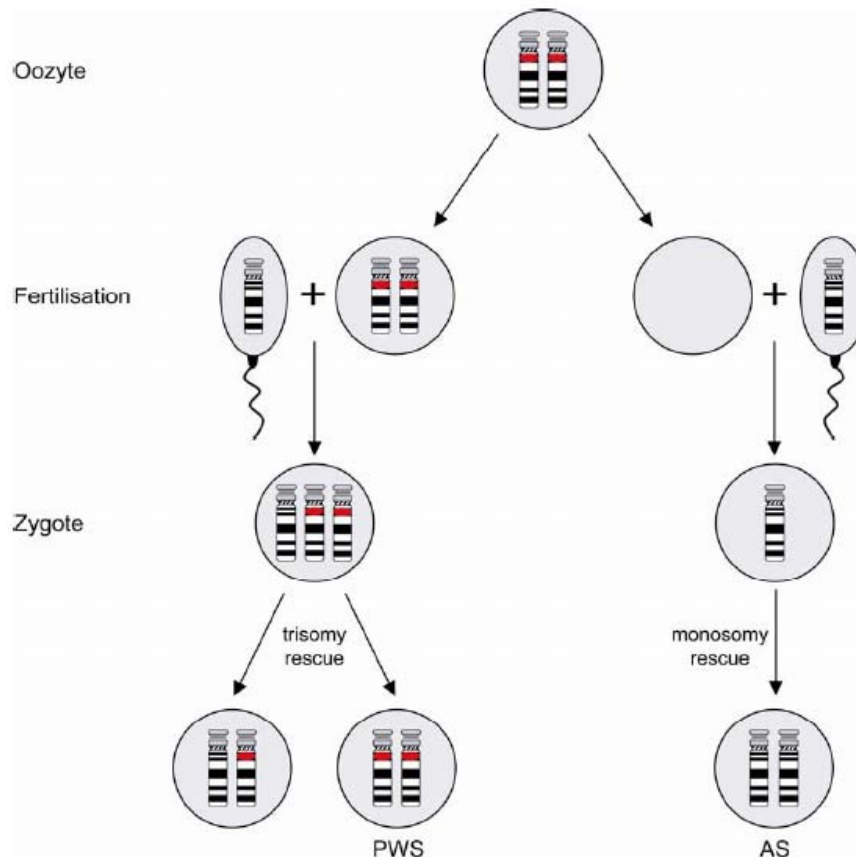


Die meisten (ca. 70 %) der betroffenen Patienten haben eine etwa 5-6 Mb große interstitielle *de novo* Deletion der Region 15q11q13 (Butler *et al.*, 1990; Knoll *et al.*, 1990; Saitoh *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1999). Bei PWS ist davon immer das paternale Chromosom betroffen (Butler und Palmer, 1983; Butler *et al.*, 1986), bei AS das maternale Chromosom (Knoll *et al.*, 1989). Es werden zwei verschiedene Klassen von Deletionen unterschieden, Klasse I und Klasse II Deletionen, wobei die Deletionsbruchpunkte in sogenannten Bruchpunktclusterregionen (BP, *breakpoint cluster regions*) liegen. Bei Klasse I und Klasse II Deletionen liegen die distalen Deletionsbruchpunkte telomerisch des *P*-Gens (BP3). Die proximalen Deletionsbruchpunkte liegen bei Klasse I Deletionen centromerisch des Gens *Nipa1* (BPI), bei Klasse II Deletionen telomerisch des Gens *TUBGCP5* (BP2) (Christian *et al.*, 1995; Christian *et al.*, 1999). Die Deletionen entstehen durch nichthomologe Rekombination der Bruchpunktclusterregionen, die 200-400 kb große duplizierte Sequenzabschnitte mit einer hohen Sequenzidentität repräsentieren (Buiting *et al.*, 1992; Buiting *et al.*, 1998a; Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 1999).

Auch eine uniparentale Disomie (UPD) kann zur Ausbildung von PWS oder AS führen. Dies bedeutet, dass die Patienten zwei Chromosomen 15 gleicher elterlicher Herkunft besitzen und es somit zum Funktionsverlust der Gene kommt, die von dem fehlenden elterlichen Chromosom exprimiert werden. Eine maternale UPD15 (upd(15)mat) führt zu PWS (Nicholls *et al.*, 1989; Mascari *et al.*, 1992), während eine paternale UPD15 (upd(15)pat) zum Angelman-Syndrom führt (Malcolm *et al.*, 1991; Knoll *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1999). Bei PWS-Patienten findet man eine upd(15)mat in 25-30% aller Fälle, bei AS-Patienten eine upd(15)pat dagegen nur in 1-3% aller Fälle.

Eine UPD entsteht nach einer Fehlverteilung während der Meiose (Abbildung 1.4). Findet eine Fehlverteilung der beiden homologen Chromosomen 15 während der Meiose I oder eine Fehlverteilung der beiden Schwesterchromatiden während der Meiose II statt, entsteht eine disome oder eine nullisome Oozyte. Durch die Befruchtung der disomen Oozyte entsteht eine trisome Zygote. Diese ist nicht lebensfähig, jedoch kann es zu einem Reparaturvorgang kommen („*trisomie-rescue*“), in dem ein Chromosom 15 verloren geht. Kommt es zum Verlust eines der maternalen Chromosomen 15, so entsteht ein normaler biparentaler Chromosomensatz für das Chromosom 15. Geht jedoch das paternale Chromosom 15 verloren, führt dies zu einer upd(15)mat. Eine Chromosomenfehlverteilung während der Meiose I führt zu einer Heterodisomie, eine Fehlverteilung in der Meiose II führt zu einer Isodisomie. Dabei besteht das Chromosom durch Rekombinationsereignisse aus isodisomen und heterodisomen Abschnitten. Es kann auch eine Monosomie 15 durch die Befruchtung

einer nullisomen Oozyte mit einem haploiden Spermium entstehen. Dies kann in der so entstandenen monosomen Zygote durch Duplikation des paternalen Chromosoms ausgeglichen werden („monosomy-rescue“). Dadurch entsteht eine paternale UPD.



**Abbildung 1.4: Entstehung einer uniparentalen Disomie 15 in der weiblichen Keimbahn**

Es ist nur das Chromosomenpaar 15 dargestellt. Der Methylierungs-Imprint in der Region 15q11q13 ist rot dargestellt (Abbildung zur Verfügung gestellt von K.Buiting).

Eine kleine Anzahl von Patienten hat einen Imprinting-Defekt (ID). In diesen Fällen trägt bei den Patienten mit PWS das väterliche Chromosom eine maternale Prägung, bei den Patienten mit AS trägt das mütterliche Chromosom eine paternale Prägung. Dies betrifft etwa 1% der PWS-Patienten und etwa 4% der AS-Patienten und wirkt sich funktionell wie eine uniparentale Disomie aus (Reis *et al.*, 1994; Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996; Bürger *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b; Buiting *et al.*, 1998).

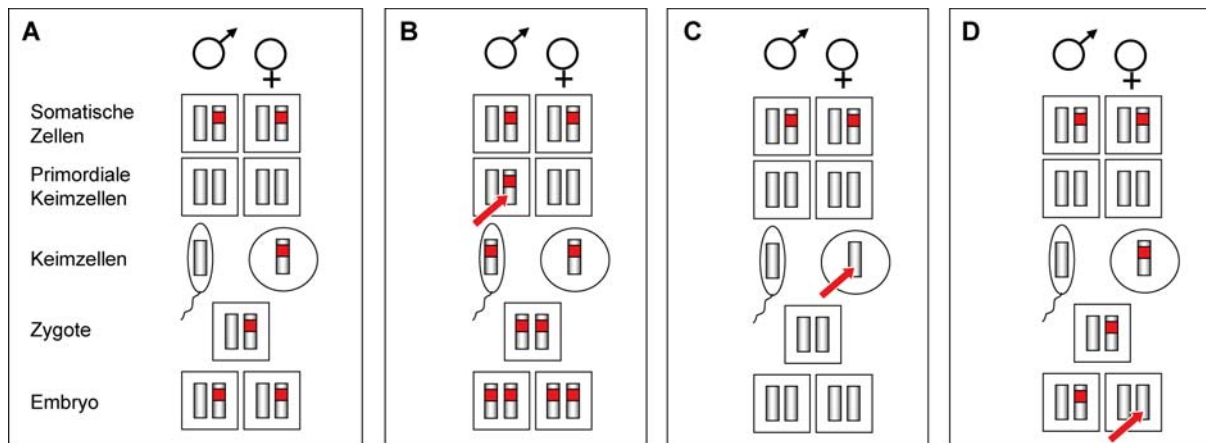
Die Ursache des Imprinting-Defekts ist in 10-15% aller Fälle auf eine Mikrodeletion des Imprinting Centers (IC) zurückzuführen (sekundäre Epimutation) (Buiting *et al.*, 1995; Saitoh

*et al.*, 1996; Schuffenhauer *et al.*, 1996; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b; Buiting *et al.*, 2000). Das Imprinting Center besteht aus zwei kritischen Elementen, dem AS-SRO und dem PWS-SRO (*smallest region of deletion overlap*). Diese Regionen sind die kleinsten überlappenden Deletionsbereiche von IC-Deletionen bei Patienten mit PWS und AS. Das AS-SRO liegt im proximalen Bereich des ICs und stellt einen 880 bp großen Bereich 30 kb stromaufwärts von *SNURF-SNRPN* entfernt dar (Buiting *et al.*, 1999). Eine Deletion dieser Region führt zur Ausbildung von AS. Der PWS-SRO ist im telomerischen Bereich des ICs lokalisiert und etwa 4.3 kb groß. Er reicht über den *SNURF-SNRPN*-Promotor bis in das Exon 1 von *SNURF-SNRPN* (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001; Ohta *et al.*, 1999a). Das IC reguliert *in cis* die DNA-Methylierung und die elternspezifische Genexpression der geprägten Region 15q11q13. Der PWS-SRO wird für die post-zygotische Aufrechterhaltung des paternalen Imprints im frühen Embryo benötigt, während der AS-SRO möglicherweise mit dem PWS-SRO interagiert, um die Etablierung des mütterlichen Imprints in der weiblichen Keimbahn zu etablieren (Buiting *et al.*, 1995; Dittrich *et al.*, 1996; Shemer *et al.*, 2000; Perk *et al.*, 2002; Kantor *et al.* 2004a; Kantor *et al.*, 2004b). Deletionen des PWS-SRO haben keinen Effekt, wenn sie durch die weibliche Keimbahn transmittiert werden, führen aber zu einem maternalen Imprint auf dem paternalen Chromosom, wenn sie vom Vater vererbt werden (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001). Bei Deletionen des AS-SRO ist dies umgekehrt, diese führen bei einer Vererbung durch die Mutter zu einem paternalen Imprint auf dem maternalen Chromosom, wenn sie durch den Vater vererbt werden, haben sie keinen Effekt.

Etwa die Hälfte aller Deletionen sind familiäre IC-Deletionen, bei denen ein 50 %iges Wiederholungsrisiko für ein weiteres Kind mit PWS bzw. AS besteht. In den restlichen Fällen ist die Deletion bei den Patienten entweder *de novo* entstanden oder die Konsequenz eines Keimbahnmosaiks bei dem entsprechenden Elternteil (Buiting *et al.*, 2003).

Bei den meisten Patienten mit Imprinting-Defekt (85 % - 90 %) tritt die Epimutation ohne Veränderungen in der DNA-Sequenz auf (primäre Epimutation) (Buiting *et al.*, 2003). Bei PWS-Patienten stammt das Chromosom 15 mit dem fehlerhaften Imprint jedoch immer von der väterlichen Großmutter (Buiting *et al.*, 2003), was wahrscheinlich an einer fehlerhaften Auslöschung der großmütterlichen Prägung in der väterlichen Keimbahn liegt (Abbildung 1.5B). Im Gegensatz dazu kann das falsch geprägte Chromosom 15 bei Patienten mit AS und einer primären Epimutation entweder von der mütterlichen Großmutter oder dem mütterlichen Großvater stammen. Dies bedeutet, dass der Imprintingfehler erst nach der Ausradierung des elterlichen Imprints in der Keimbahn auftritt. Dies könnte entweder durch einen Fehler in der

Etablierung oder in der Aufrechterhaltung des Imprints begründet sein (Abbildung 1.5CD). Bei etwa einem Drittel aller AS-Patienten mit primärer Epimutation liegt ein somatisches Mosaik vor. Diese Patienten besitzen einen unterschiedlichen Anteil an normalen Zellen und Zellen mit Imprinting-Defekt (Nazlican *et al.*, 2004). Bei PWS-Patienten findet man solche somatischen Mosaik sehr selten (Wey *et al.*, 2005).



**Abbildung 1.5: Ursachen von Imprinting-Defekten**

Es ist nur ein Chromosomenpaar dargestellt. Der maternale Methylierungsimprint ist rot dargestellt. A) Das maternale Chromosom trägt in somatischen Zellen einen maternalen Imprint. Dieser wird in den primordialen Keimzellen ausradiert, in den Oozyten neu etabliert und in der Zygote und im Embryo aufrechterhalten. Imprinting Defekte (rote Pfeile) können durch Fehler in der Auslöschung (B), der Etablierung (C) und der Aufrechterhaltung (D) des Imprints entstehen. (Abbildung zur Verfügung gestellt von B. Horsthemke)

Bei 5-10% aller AS-Patienten kann man eine Mutation im *UBE3A*-Gen auf dem mütterlich ererbten Chromosom 15 nachweisen (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997). Die meisten Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stop-Codon und somit zu einem Funktionsverlust des Enzyms. Dies führt zur Ausbildung von AS.

### 1.2.2 Die Gene der PWS/AS-Region

Die chromosomale Region 15q11q13 unterliegt dem genomischen Imprinting und enthält Gene, die für die Ausbildung von PWS und AS verantwortlich sind. Mehrere der in dieser Region lokalisierten Gene werden ausschließlich vom paternalen Chromosom exprimiert (*MAKORIN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, *SNURF-SNRPN*, *SNORD*-Gene), während zwei Gene,

*UBE3A* und *ATP10C*, ausschließlich vom maternalen Chromosom exprimiert werden (Abb. 1.3). Die paternal exprimierten Gene *NECDIN* und *SNURF-SNRPN* weisen in ihrem 5'Bereich eine differentiell methylierte Region auf. Diese ist auf dem paternalen Chromosom unmethyliert, auf dem maternalen Chromosom methyliert (Glenn *et al.*, 1993; Zeschnigk *et al.*, 1997). Die elternspezifische Expression von *SNURF-SNRPN* steuert gleichzeitig indirekt die Expression der in den Introns gelegenen *SNORD*-Gene, die somit auch ausschließlich vom paternalen Chromosom exprimiert werden. Die maternal exprimierten Gene *UBE3A* und *ATP10C* weisen keine solche differentiell methylierte Region auf. Möglicherweise erfolgt die Expressionskontrolle über ein *SNURF-SNRPN*-Sense/*UBE3A*-Antisense-Transkript, welches durch die eigene Expression eine Expression von *UBE3A* auf dem paternalen Chromosom verhindert (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain und Brannan, 2001; Yamasaki *et al.*, 2003; Runte *et al.*, 2004).

Das am weitesten centromerisch gelegene geprägte Gen der Region ist das ubiquitär exprimierte *MAKORIN3* (*MKRN3*). Es ist intronlos und codiert für ein Protein mit mehreren Zinkfingermotiven, die auf eine Funktion als Ribonukleoprotein hinweisen (Jong *et al.*, 1999). Etwa 160 kb weiter distal liegt das ebenfalls intronlose Gen *MAGEL2* (*melanoma antigene gene expression like 2*). Es gehört zu der Gruppe der MAGE-Proteine und wird fast ausschließlich im Gehirn exprimiert (Boccaccio *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass *MAGEL2* in die Steuerung des circadianen Rhythmus involviert ist, so zeigen *MAGEL2*-Knockout-Mäuse eine veränderte Tag-Nacht-Aktivität (Kozlov *et al.*, 2007). *NECDIN* liegt 41 kb distal von *MAGEL2*. Es gehört ebenfalls zur Gruppe der MAGE-Proteine und wird beim Menschen ubiquitär exprimiert (Jay *et al.*, 1997; MacDonald und Wevrick, 1997). Bei der Maus wird das orthologe Gen vor allem in postmitotischen Neuronen im Hypothalamus und anderen Hirnregionen exprimiert (Uetsuki *et al.*, 1996; Gerard *et al.*, 1999; Muscatelli *et al.* 2000). *NECDIN* ist während der neuronalen Differenzierung hochreguliert und *in vitro*-Experimente haben gezeigt, dass dieses Gen zu einer Supprimierung der Zellproliferation führt.

Distal von *NECDIN* liegen die die nichtproteincodierenden Gene *PWRN1* und *PWRN2* (*prader-willi region non-protein coding RNA 1* und 2) (Buiting *et al.*, 2007). *PWRN1* wird in mehreren humanen Geweben wie z.B. Testis, fetalem Gehirn, Herz und Niere exprimiert, während eine Expression von *PWRN2* nur in Testis nachgewiesen werden konnte. Dort erfolgt die Expression, ebenso wie von *PWRN1*, biallelisch. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass *PWRN1* in fetalem Gehirn monoallelisch exprimiert wird (Buiting *et al.*, 2007).

Das intronlose Gen *C15orf2* liegt in unmittelbarer Nachbarschaft von *PWRN1* und wurde im Jahr 2000 durch die nähere Untersuchung eines CpG-Islands etwa 300 kb centromerisch von *SNURF-SNRPN* identifiziert (Färber *et al.*, 2000). Durch Sequenzierungsanalysen konnte ein offener Leserahmen (*open reading frame*, ORF) von 3,5 kb identifiziert werden, der für ein putatives Protein von 1152 Aminosäuren codiert. In Northern-Blot-Hybridisierungen an RNA aus verschiedenen Geweben konnte ausschließlich in Testis ein 7,5 kb großes Transkript detektiert werden. Nachfolgende Analysen zeigten, dass *C15orf2* jedoch auch in fetalem Gehirn exprimiert ist und dass die Expression in diesem Gewebe monoallelisch erfolgt (Buiting *et al.*, 2007). Es wurde durch Methylierungsanalysen festgestellt, dass das CpG-Island von *C15orf2* nur in Spermien unmethyliert ist, in den meisten anderen getesteten Geweben hingegen vollständig methyliert vorliegt (Färber *et al.*, 2000). Es existiert kein homologes Gen in der Maus und der Ratte, jedoch in allen Primaten und auch in anderen Säugern wie Hund, Rind und Elefant. Ein interessanter Aspekt von *C15orf2* ist seine potentielle evolutionsbiologische Bedeutung. So wurde in zwei Arbeiten eine positive Selektion für dieses Gen berichtet. Nielsen *et al.*, (2005) fanden durch die Berechnung des Quotienten von nichtsynonymen SNPs zu synonymen SNPs bei 13.731 Genen von Menschen und Schimpansen, dass *C15orf2* den sechsthöchsten Wert besitzt. In einer neueren Arbeit von Kosiol *et al.*, 2008 wurde bei dem Vergleich von etwa 16.500 Genen in sechs Säugergenomen für *C15orf2* der hundertsechsthöchste Wert berechnet.

Der *SNURF-SNRPN*-Locus ist der komplexeste Locus der Region. *SNURF-SNRPN* wurde ursprünglich als ein aus zehn Exons bestehendes bicistronisches Gen beschrieben (Özcelik *et al.*, 1992). Die Exons beinhalten 2 ORFs (*open reading frames*) mit der Sequenzinformation für zwei verschiedene Proteine (Gray *et al.*, 1999a). Die Exons 1-3 codieren für das aus 71 Aminosäuren bestehende Protein SNURF (*SNRPN upstream reading frame*), ein kleines Polypeptid mit unbekannter Funktion, welches im Zellkern lokalisiert ist und RNA-bindende Eigenschaften besitzt (Gray *et al.*, 1999a). Die Exons 4-10 codieren für das aus 240 Aminosäuren bestehende Protein SmN. Es ist Teil des Spleißosomen-Komplexes und spielt eine Rolle beim Spleißen der RNA im Gehirn, wo es das konstitutiv exprimierte SmB'/B-Protein ersetzen kann (Gray *et al.*, 1999b).

Es konnten alternative Transkripte mit proximal von *SNURF-SNRPN* lokalisierten 5'-Exons identifiziert werden. Für diese Upstream-Transkripte konnten zwei unterschiedliche Startpunkte identifiziert werden, die Upstream-Exons *UIA* und *UIB*, die untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Die Transkripte überspannen das IC, weshalb sie auch *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte genannt werden. Der AS-SRO des ICs umfasst die Region

der Upstream-Exons *U5* und *U6*, der PWS-SRO die Region vor dem regulären Exon 1 von *SNURF-SNRPN* und überspannt den Promotorbereich und Exon 1 des Gens. Die Transkripte werden alle auf Exon 2 von *SNURF-SNRPN* gespleißt (Dittrich *et al.* 1996; Färber *et al.*, 1999) und ihre Funktion konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise sind sie in der Imprint-Umschaltung in der Keimbahn involviert (Dittrich *et al.*, 1996). Die Expression der Transkripte konnte bei der Maus hauptsächlich im Gehirn, jedoch auch in Oozyten nachgewiesen werden (Mapendano *et al.*, 2006).

Durch Methylierungsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Startexons der *SNURF-SNRPN*-Upstream-Transkripte eine elternspezifische Methylierung zeigen. Das paternale Allel ist unmethyliert, während das maternale Allel methyliert vorliegt (Zeschnigk *et al.*, 1997; Färber *et al.*, 1999; Dissertation Corinna Zogel 2007). Die Expression der Transkripte erfolgt ausschließlich vom unmethylierten paternalen Allel. Bei Methylierungsanalysen des *UID*-Exons, das 63 kb proximal von *UIB* liegt und eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *UIA* und *UIB* zeigt, konnte keine allelspezifische Methylierung gefunden werden (Dissertation Corinna Zogel 2007). Einzig eine *CfoI*-Schnittstelle, 3,3 kb von *UID* entfernt, zeigte in Southern-Blot-Analysen und in der Klonierung und Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung in Blut-DNA eine differentielle Methylierung. Vor einigen Jahren konnten zusätzlich alternativ gespleißte Transkripte von *SNURF-SNRPN* identifiziert werden, die neue 3'Exons enthalten (Buiting *et al.*, 1997; Runte *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2001). Diese überspannen einen genomischen Bereich von 460 kb und überlappen mit dem Gen *UBE3A* in „antisense“-Orientierung. Dieses *UBE3A*-Antisense-Transkript konnte sowohl beim Menschen als auch in der Maus identifiziert werden (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain und Brannan., 2001). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die *IPW*-Exons Bestandteil dieser komplexen *SNURF-SNRPN*-Sense/*UBE3A*-Antisense-Transkriptionseinheit sind und kein unabhängiges, nichtcodierendes Gen repräsentieren (Runte *et al.*, 2001).

Der *SNURF-SNRPN*-Locus dient auch als Wirtsgen für kleine nukleäre RNAs (*small nucleolar RNAs*, snoRNAs), deren Gene (*SNORDs*) in den Introns der Transkriptionseinheit lokalisiert sind. SnoRNAs sind kleine, metabolisch stabile RNAs, deren Gene meist in Introns von Haushaltsgenen liegen und durch den Spleißprozess freigesetzt und aktiviert werden (Fragapane *et al.*, 1993; Tycowski *et al.*, 1993; Maxwell und Fournier, 1995; Cavaille und Bachellerie, 1996). Sie sind beteiligt an der posttranskriptionellen Modifikation von Nukleotiden ribosomaler RNA (rRNA). Die snoRNAs werden aufgrund ihrer Sequenzmotive in zwei Gruppen eingeteilt, die C/D-Box snoRNAs und die H/ACA-Box snoRNAs. Durch

Bildung spezifischer Basenpaarungen, die das zu modifizierende rRNA-Nukleotid spannen, sind C/D-Box snoRNAs in 2'-O-Ribose-Methylierungen und H/ACA-Box snoRNAs in Pseudouridinylierungen involviert (Kiss-Lazlo *et al.*, 1996; Bachellerie und Cavaille, 1997; Ganot *et al.*, 1997; Smith und Steitz, 1998). Die snoRNAs des *SNURF-SNRPN*-Locus gehören zu den C/D-Box snoRNAs und kommen als Einzelgen-Kopie (*SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD108*, *SNORD109A* und *SNORD109B*) oder als Multigen-Cluster (*SNORD116* und *SNORD115*) vor. Das *SNORD115*-Cluster besteht aus 47 Kopien, das weiter proximal gelegene *SNORD116*-Cluster aus 27 Genkopien. Diese snoRNAs werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, eine Ausnahme bildet *SNORD115*, dessen Expression ausschließlich im Gehirn detektiert werden konnte.

Da den snoRNAs die Komplementarität zu rRNA-Sequenzen fehlt, ist die Funktion nicht bekannt. Sahoo *et al.* (2008) schlagen jedoch durch die Analyse eines PWS-Patienten mit einer Mikrodeletion von *SNORD116* vor, dass dieses Gen für die Hauptcharakteristika des PWS-Phänotyps verantwortlich ist, während die fehlende Expression der weiteren paternal exprimierten Gene eine modulierende Wirkung auf den Phänotyp haben sollen. Des Weiteren konnten de Smith *et al.* (2009) durch die Analyse eines Patienten, bei dem PWS molekulargenetisch nicht nachgewiesen werden konnte, der jedoch die typischen Symptome eines PWS wie Hyperphagie, Adipositas und Hypergonadismus zeigt, eine Mikrodeletion von *SNORD116* nachweisen. Dass *SNORD116* verantwortlich für einige Symptome von PWS ist, wird bestärkt durch zwei Mausmodelle, in denen eine Deletion des homologen Gens auf dem paternalen Chromosom 7 einen PWS-ähnlichen Phänotyp mit postnataler Wachstumsretardierung und Hyperphagie hervorruft (Ding *et al.*, 2008; Skryabin *et al.*, 2007). Eine Beteiligung von *SNORD115* zum PWS-Phänotyp konnte durch die Analyse zweier Familien mit einer Deletion, die *UBE3A* und *SNORD115* überspannt, ausgeschlossen werden. Individuen, die diese Deletion auf dem paternal ererbten Chromosom tragen, zeigen keinen klinischen Phänotyp (Hamabe *et al.*, 1991; Runte *et al.*, 2005).

Distal der PWS-kritischen Region wurde das Gen für die E6-AP Ubiquitin Protein Ligase 3A (*UBE3A*) lokalisiert (Sutcliffe *et al.*, 1997). Dieses Enzym markiert Proteine mit Ubiquitin und führt diese so der Degradierung durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse zu (Scheffner *et al.*, 1995). *UBE3A* wird in bestimmten Gehirnbereichen des Menschen und der Maus ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert (Rougeulle *et al.*, 1997; Vu und Hoffmann, 1997; Albrecht *et al.*, 1997), während es in anderen Geweben biallelisch exprimiert wird (Sutcliffe *et al.*, 1997; Rougeulle *et al.*, 1997; Vu und Hoffmann, 1997).



Etwa 200 kb distal von *UBE3A* ist das Gen *ATP10C* lokalisiert, das im Gehirn ebenfalls preferentiell vom mütterlichen Allel exprimiert wird und für eine putative Aminophospholipid Translokase codiert (Meguro *et al.*, 2001; Herzing *et al.*, 2001).

Die *de novo*-Deletionen der Patienten mit PWS und AS betreffen auch Gene, die nicht dem Imprinting unterliegen und biallelisch exprimiert werden. Distal von *ATP10C* liegen die Gene für die GABA-Rezeptoren *GABR3*, *GABRA5* und *GABRG3*. Der Verlust dieser Gene wird mit einer Modifizierung des AS-Phänotyps diskutiert (DeLorey *et al.*, 1998). Noch weiter distal ist das *P*-Gen (*pink-eyed dilution*-Gen) lokalisiert, welches mit Oculocutanem Albinismus Typ 2 (*OCA2*) assoziiert ist. Der Verlust einer Genkopie führt bei AS- und PWS-Patienten zu einer Hypopigmentierung (Spritz *et al.*, 1997).

Centromerisch der geprägten Region befinden sich vier Gene *NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* und *GCP5*, die nicht elternspezifisch exprimiert werden und für die Patienten mit einer Klasse I Deletion hemizygot sind. Heterozygote Mutationen in *NIPAI* führen zu einer autosomal dominanten spastischen Paraplegie (Rainier *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2005), die jedoch noch nie bei PWS-Patienten beobachtet werden konnte. Somit führt wahrscheinlich keine reduzierte Gendosis, sondern ein mutantes Protein zu dieser Erkrankung. Eine Deletion dieser vier Gene konnte mit klinischen Symptomen von PWS-Patienten in Verbindung gebracht werden. So sollen PWS-Patienten mit einer Klasse I Deletion häufiger Verhaltensauffälligkeiten zeigen als solche mit einer Klasse II Deletion (Butler *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse wurden jedoch noch nicht bestätigt.

### 1.3 Zielsetzung

In der dem genomischen Imprinting unterliegenden PWS/AS-Genregion auf Chromosom 15q11q13 werden einige Gene ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert. Dies trifft auch für die Transkripte der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit zu. Diese Transkriptionseinheit besteht aus proteincodierenden Exons und den sogenannten Upstream-Exons, die möglicherweise in die Imprint-Umschaltung in der Keimbahn involviert sind. Zur weiteren Klärung der Funktion der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte sollte deren Expressionsverhalten in der männlichen Keimbahn untersucht werden. Des Weiteren sollte versucht werden, epigenetische Faktoren zu identifizieren, die an der Keimzellentwicklung beteiligt sein könnten. Dazu sollten im Rahmen dieser Dissertation Genexpressionsdaten analysiert werden, die aus Testisbiopsaten von fertilen Männern sowie von Männern mit unterschiedlichen Störungen in der Spermatogenese erstellt wurden.

Die paternale Expression der in 15q11q13 lokalisierten Gene wird über elternspezifische DNA-Methylierung differentiell methylierter Regionen (DMRs) und CpG-Islands reguliert. In Verlauf dieser Arbeit sollten weitere, neu identifizierte CpG-Islands innerhalb der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit auf das Vorliegen einer differentiellen Methylierung hin untersucht werden.

Für die Gene *PWRN1* und *C15orf2*, die innerhalb eines Clusters paternal exprimierter Gene lokalisiert sind, konnte bislang nur eine monoallelische Expression nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob die Expression tatsächlich wie die der benachbarten Gene vom paternalen Allel erfolgt. Im Gegensatz zu *PWRN1* ist *C15orf2* proteincodierend, das Protein ist jedoch bislang noch nicht nachgewiesen worden. Im Verlauf dieser Arbeit sollte das Protein nachgewiesen werden und Analysen zur Lokalisation durchgeführt werden. Durch einen populationsgenetischen Ansatz sollten außerdem weitere Hinweise auf eine mögliche positive Selektion von *C15orf2* gefunden werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Clontech (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (NEB), Roth (Karlsruhe), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg), GibcoBRL (Eggenstein), MBI, Fermentas, Peqlab (Erlangen), BD (Heidelberg), Roche (Mannheim) und MWG in *pro analysis* Qualität bezogen.

#### 2.1.2 Standardlösungen

6x DNA Probenpuffer:	0,25 %	Bromphenolblau oder Xylenblau,
	15 %	Ficoll,
	10 mM	EDTA
TAE-Puffer:	40 mM	Tris-Acetat,
	1 mM	EDTA, pH 8,0
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,8
	1 mM	EDTA
PBS:	137 mM	NaCl,
	2,7 mM	KCl,
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,3 einstellen	

### 2.1.3 Medien

#### 2.1.3.1 Medien für die Kultur von Bakterien

LB-Medium:	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1 %	NaCl
	pH 7,5 mit NaOH einstellen	
LB-Platten:	LB-Medium,	
	1,2 %	Bacto-Agar (Difco)
Ampicillin:	Endkonzentration 100 µg/ml	
X-Gal:	Endkonzentration 35 µg/ml	

#### 2.1.3.2 Medien für die Kultur von Zellen

D-MEM (Gibco)	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (pH 7,0), 4,5 g/l D-Glukose, 29,23 g/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub>	
Opti-MEM <sup>®</sup> I (Gibco)	Serumreduziertes Medium , 24 g/l L-Glutamin	
FKS (Gibco)	Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	
Trypsin/EDTA:	2 g/l	Trypsin
	0,2 g/l	EDTA
	in PBS (pH 7,2) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	

## 2.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien

### 2.1.4.1 Bakterienstamm

*E. coli* DH5 $\alpha$ : F', endA1, hsdR17, ( $r_k^-m_k^+$ ), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal<sup>r</sup>), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, ( $\Phi$ 80dlacD(lacZ)M15)

### 2.1.4.2 Zelllinien

HeLa humane Zervixkarzinom-Epithel-Zelllinie  
(ATCC Number CCL-2, adhären, DMEM)

HEK-293 humane embryonale Nierenzelllinie  
(ATCC Number CRL-1573, adhären, DMEM)

### 2.1.5 Plasmide

pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Promega)

pCMV6-Entry\_C15orf2 Expressionsvektor für die Überexpression von *C15orf2*  
(OriGene, Cat.No. RC224310)

pBluescript II KS Vektor zur Synthese von *in situ*-Hybridisierungssonden

### 2.1.6 Größenstandards

DNA-Größenmarker: 1 kb DNA Leiter, GibcoBRL  
pUC19 *Msp*I geschnitten, MBI Fermentas

Protein-Größenmarker: PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas)

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide oder Primer, die nicht bereits im Institut etabliert waren, wurden mit dem Programm Primer3 ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) erstellt. Die einzelnen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

### 2.1.8 Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen:

Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche (Mannheim) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

#### weitere Enzyme:

*AmpliTaq* Gold Polymerase (Roche)

T4-DNA-Ligase (Roche)

HotstarTaq (Qiagen)

### 2.1.9 Antikörper

Rabbit anti-C15orf2 polyclonal antibody, hergestellt auf Anfrage durch Immunisierung von Kaninchen gegen das Epitop TPQPKFEAPDGQPQK (AS 644-658) des C15orf2 Proteins mit anschließender Affinitätsaufreinigung (Eurogentec)

Mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Stratagene, Katalog-Nr. 200471)

Goat anti-Rabbit Cy3 (Dianova, Katalog-Nr. 111-165-003 )

Goat anti-Mouse Cy3 (Dianova, Katalog-Nr. 115-165-062)

Stabilized Goat anti-Rabbit HRP Conjugated (PIERCE, Katalog-Nr. 1858415 )

Stabilized Goat anti-Mouse HRP Conjugated (PIERCE, Katalog-Nr. 1858413)

### 2.1.10 cDNA

Human Testis Marathon-Ready cDNA (Clontech)

Human Fetal Brain Marathon-Ready cDNA (Clontech)

### 2.1.11 RNA

Human Total RNA Master Panel II (BD Biosciences)

### 2.1.12 Patienten

Die klinische Diagnose der Patienten mit Prader-Willi-Syndrom bzw. Angelman-Syndrom wurde von erfahrenen Humangenetikern gestellt. Die Methylierungsanalyse der *SNURF-SNRPN* Promotor/Exon 1 Region mittels methylierungs-spezifischer PCR (MS-PCR; Zeschnigk *et al.*, 1997b) zeigte, dass den Patienten mit PWS das unmethylierte Allel fehlt und den Patienten mit AS das methylierte Allel. Bei Patienten mit einem Imprintingdefekt wurde eine biparentale Vererbung der PWS/AS Region mittels Mikrosatellitenanalyse nachgewiesen. Eine IC-Deletion wurde mit Hilfe einer Southern-Blot-Analyse (nach Southern, 1975), einer quantitativen TaqMan-Analyse (Raca *et al.*, 2004) oder MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ausgeschlossen bzw. bestätigt. Bei Ausschluss einer IC-Deletion wurde dieser Befund zusätzlich durch Sequenzierung von SNPs (*single nucleotide polymorphism*) im AS-SRO oder PWS-SRO bestätigt. Bei Patienten mit einer *de novo* Deletion von 15q11q13 wurde die Deletion entweder durch FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung), MLPA oder Mikrosatellitenanalyse diagnostiziert. Bei Patienten mit einer uniparentalen Disomie wurde diese durch Mikrosatellitenanalyse bestätigt.

### 2.1.13 Gewebe

Für Western-Blot-Analysen wurde Gehirngewebe unterschiedlicher Regionen einer 54-jährigen Frau verwendet, die an einem Herzinfarkt nach einer Lebertransplantation verstorben ist. Die Proteine wurden 20h post mortem präpariert. Auch wurde Hirngewebe und

Testisgewebe eines 84-jährigen Mannes verwendet, der an Bronchopneumonie verstorben ist. Die Proteine wurden 16h post mortem präpariert. Die Untersuchungen an diesen Geweben wurden von der Ethikkommission des Essener Universitätsklinikums genehmigt.

Für immunhistologische Färbungen und *in situ*-Hybridisierungen wurden die Hypothalami von 8 Individuen von der Netherlands Brain Bank verwendet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten mit DNA**

#### **2.2.1.1 Isolierung von DNA aus peripherem Blut**

Zur Präparation von genomischer DNA aus Blut wurden zwei unterschiedliche Methoden der Firma Qiagen verwendet.

##### DNA-Präparation mit FlexiGene

Zu 7.5 ml FG1-Puffer wurden 3 ml EDTA-Blut gegeben und fünfmal invertiert. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 x g) und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 1,5 ml mit Protease versetztem FG2-Puffer gegeben. Das Pellet wurde homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 1,5 ml 100 %iges Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und der Ansatz für 3 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 2000 x g wurde der Überstand verworfen, das Pellet 5 min an der Luft getrocknet und in 300 µl FG3-Puffer 1 h im 65 °C-Heizblock, und anschließend bei RT über Nacht auf einem Taumel-Rollenmischer gelöst.

##### DNA-Präparation mit der BioRobot EZ1 Workstation

Die Präparation von DNA mit der BioRobot EZ1 Workstation von Qiagen funktioniert vollautomatisch und nach dem Prinzip der Trennung mit magnetischen Perlen (*beads*). Die einzelnen Schritte sind im Folgenden kurz zusammengefasst: Die Zellen werden mit



Proteinase K aufgeschlossen und mit magnetischen Partikeln gemischt, an denen die DNA bindet. Durch ein magnetisches Feld werden die Partikel mit der DNA von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Nach einem Waschschrift wird das magnetische Feld abgestellt und die DNA eluiert.

### 2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die analytische Präparation wurde eine Bakterieneinzelkolonie (*E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ ) über Nacht in 3 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Aus 1,5 ml der Übernachtskultur wurden die Zellen sedimentiert (4 min, 2600 x g), das Pellet in 300  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 300  $\mu$ l Puffer P2 lysiert. Dann wurden 300  $\mu$ l Puffer P3 zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe zugegeben und 15 min bei 10300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 500  $\mu$ l 100 %igem Ethanol versetzt und das DNA-Präzipitat sedimentiert (20 min, 16000 x g). Das Pellet wurde mit 300  $\mu$ l 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur Gewinnung größerer Mengen gereinigter Plasmid-DNA wurde das „Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) verwendet. Hierzu wurden 250 ml Bakteriensuspension sedimentiert und die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde in 100 – 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Puffer P1:	10 mM	EDTA
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100 $\mu$ g/ml	RNase A
Puffer P2:	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat
	mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen	

### 2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) (nach Mullis *et al.*, 1986)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion wurden DNA-Fragmente aus genomischer oder Plasmid-DNA amplifiziert. Standardmäßig wurde die *AmpliTaq*<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase (Roche) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 1 x Polymerasepuffer, jeweils 0,2 – 0,4 µM eines 5' und eines 3' Oligodesoxynukleotids (Primer), 200 µM dNTPs, 2,5 U Polymerase und 100 – 200 ng Matrizen DNA. Das Endvolumen betrug 50 µl. Es wurden in der Regel 35 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 30 sec, das Primer-Annealing für 30 sec, wobei die Annealing-Temperatur abhängig von den  $T_m$ -Werten der Primer war, und die Elongation erfolgte bei 72 °C. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des Amplifikats (1 min/kb). Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 10 min bei 95 °C eingefügt, nach dem letzten Zyklus eine Elongationsphase von 7 min bei 72 °C.

Um bisulfitbehandelte DNA (siehe 2.2.1.12) zu amplifizieren, wurde das HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) verwendet. Einer initialen Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 15 min folgten 35 Zyklen aus je 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Primer-Annealing, wobei die Annealing-Temperatur abhängig von den  $T_m$ -Werten der Primer war, und 30 sec Elongation bei 72 °C, wobei sich die Elongationszeit nach der Größe des Amplifikats richtete (1 min/kb). Anschließend erfolgte eine verlängerte Elongationsphase für 10 min bei 72 °C

### 2.2.1.4 Fragmentlängenanalyse

Für die Fragmentlängenanalyse von PCR-Produkten wurde zunächst eine PCR-Analyse an 50 – 100 ng genomischer DNA mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt (siehe 2.2.1.3), wobei der 3'-Primer an seinem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (6-FAM<sup>™</sup>) gebunden hatte. Die PCR-Produkte wurden mit dem ABIprism 3100 Genetic Analyzer und der *GeneScan*<sup>™</sup> Analyse-Software sowie dem Programm *Genotyper* (Applied Biosystems) analysiert.

### 2.2.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde entweder das MultiScreen Filtrationssystem (Millipore) oder Microcon-Säulen (Millipore) benutzt und nach Vorschrift des Herstellers

verfahren. Alternativ wurden PCR-Produkte mit ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB) aufgereinigt, wobei es zu keinem Verlust des PCR-Produkts kommt.

#### **2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur größenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 bis 2 %ige Agarose-Minigele mit 1 x TAE-Puffer und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Den DNA-Proben wurde 10 x DNA Probenpuffer zugegeben und die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 – 120 Volt in TAE-Laufpuffer mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid. Zur Ermittlung der spezifischen Größe der jeweiligen DNA-Fragmente dienten spezifische Größenstandards (siehe 2.1.6). Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid konnten die DNA auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 302 \text{ nm}$  sichtbar gemacht werden.

#### **2.2.1.7 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder das MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mit einem dreifachen Gelvolumen Puffer QC versetzt und bei 50 °C für 10 min aufgelöst. Der Lösung wurde anschließend mit einem Gelvolumen Isopropanol gemischt und der Ansatz auf eine QIAquick Säule pipettiert. Nach Zentrifugation (1 min, 10000 x g) wurde mit 750 µl PE Puffer gewaschen und die DNA in 30 – 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **2.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die genaue Konzentration von DNA wurde photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers ND-1000 bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> 1,8.

Alternativ wurde die ungefähre DNA-Konzentration durch Auftragung eines Aliquots auf ein Agarosegel bestimmt. Durch den Intensitätsvergleich der Banden mit dem pUC19 *MspI* geschnittenem Marker, bei dem die Konzentrationen der einzelnen Banden bekannt waren, konnte die DNA-Konzentration abgeschätzt werden.

#### **2.2.1.9 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurde mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1/v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Einer 10 µl Sequenzierungsreaktion wurden 4 µl Terminator Ready Reaction Mix BigDye, 10 – 100 ng DNA als Matrize und 5 pmol des jeweiligen Primers zugesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 1 min bei 96 °C eingefügt. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 96 °C für 10 sec, das Primer-Annealing bei 50 – 60 °C (abhängig von dem T<sub>m</sub>-Wert des Primers) für 5 sec und die Elongation bei 60 °C für 4 min. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über Sephadex Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Analyse erfolgte auf dem Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit den Programmen "Sequencing Analysis" (Applied Biosystems), "DNA Star" (Lasergene) oder "Sequencher" (Gene Codes Corporation).

#### **2.2.1.10 Restriktionsendonukleaseverdau**

Für analytische und präparative Zwecke wurden 1 – 3 µg Plasmid-DNA mit 10 – 20 U Restriktionsendonuklease und dem vom Hersteller mitgeliefertem Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bei 37 °C verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab der Reaktion angepasst, war jedoch nie größer als 10 % des Gesamtvolumens. Somit wurde sichergestellt, dass die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wurde.

### **2.2.1.11 Ligation**

Die Ligation mit einem Gesamtvolumen von 15 µl wurde mit 5 U T4 DNA Ligase (Roche) durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA betrug 1:3. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

PCR-Produkte wurden standardweise zunächst in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor subkloniert, wobei nach Anleitung des Herstellers verfahren wurde.

### **2.2.1.12 Bisulfitbehandlung von DNA**

Durch die Bisulfitbehandlung werden nicht-methylierte Cytosine deaminiert und somit in Uracil umgewandelt. Methylierte Cytosine sind gegen diese chemische Umwandlung geschützt und verbleiben als Cytosine. Bei der anschließenden PCR wird das Uracil durch Thymin ersetzt. Die dadurch entstehenden spezifischen Sequenzunterschiede zwischen methylierten und nicht methylierten Allelen können in der Analyse des Methylierungsstatus genutzt werden.

Für die Bisulfitbehandlung wurden 2 µg DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Denaturierung der DNA wurden 5,5 µl 3 M NaOH dazugegeben. Der Ansatz wurde zuerst 15 min bei 37 °C und danach 2 min bei 95 °C im vorgeheizten Heizblock denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA zu vermeiden. Für die Bisulfit-Lösung wurden 8,5 g Natriumbisulfit in 15 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 0,9 ml 50 mM Hydrochinon und 1 ml 10 N NaOH (pH 5,0 – 5,3) wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 20 ml aufgefüllt. Zu der denaturierten DNA wurden 500 µl der Bisulfit-Lösung gegeben und der Ansatz über Nacht bei 50 °C im Dunkeln inkubiert. Für die Aufreinigung der bisulfitbehandelten DNA wurde das Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up-System (Promega) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die bisulfitbehandelte und aufgereinigte DNA wurde mit 5,5 µl 3 M NaOH 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 55 µl 6 M NH<sub>4</sub>OAc, 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 350 µl Ethanol (100 %) zugegeben, und die DNA durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 16000 x g präzipitiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.1.13 TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays**

Die allelische Diskriminierung erfolgte unter anderem mittels TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays von Applied Biosystems. Es wurden TaqMan<sup>®</sup> Pre-Designed SNP Genotyping Assays (Assays-on-Demand) verwendet. Die Assays enthalten zwei Primer um den zu analysierenden Bereich zu amplifizieren und zwei fluoreszenzmarkierte Sonden, die spezifisch an je ein Allel binden. Die Sonde für das Allel 1 ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC markiert, die Sonde für das Allel 2 ist FAM markiert. Zusätzlich enthalten die Sonden noch einen nichtfluoreszierenden Quencher, der, solange die Sonde intakt ist, die Fluoreszenz unterdrückt. Während der PCR lagert sich jede Sonde spezifisch an ein Allel an. Die DNA-Polymerase verlängert die Primer am 3' Ende und degradiert durch ihre 5' – 3' Nuklease-Aktivität die Sonden, die an die DNA hybridisiert haben. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Sonden die nicht an die DNA hybridisiert haben werden nicht gespalten und es kommt zu keinem Fluoreszenzsignal. Je nach gemessenem Fluoreszenzsignal (VIC oder FAM) kann nun bestimmt werden, welche Allele vorhanden sind. Die PCR-Reaktion wurde mit 10 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 5 µl durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren folgende: Zunächst erfolgte eine Denaturierung bei 95 °C für 10 min, dann folgten 40 Zyklen aus je 15 sec Denaturierung bei 92 °C und 1 min Kombination aus Annealing und Elongation bei 60 °C. Die Proben wurden in einem ABI PRISM Sequence Detection System 7900HT analysiert. Zur Auswertung wurde die SDS 2.2 Software für allelische Diskriminierung (Applied Biosystems) verwendet. Die verwendeten Assays-on-Demand sind im Einzelnen im Anhang (Seite 105) aufgeführt.

## **2.2.2 Arbeiten mit RNA**

### **2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die genaue Konzentration von RNA wurde photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers ND-1000 bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 40 µg/ml RNA. Bei reiner RNA beträgt der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> zwischen 1,8 und 2,1.

#### 2.2.2.2 DNase I-Behandlung von RNA

Falls nach der Präparation noch genomische DNA im RNA-Ansatz vorhanden war, wurde eine DNase I-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden in einem Ansatz ca. 5 µg RNA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCL, 3 Units DNase I und 1 Unit RNase Inhibitor gemischt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Denaturierung bei 95 °C für 5 min und die RNA wurde bei -80 °C eingefroren.

#### 2.2.2.3 Reverse Transkription von cDNA (RT-PCR)

Die RNA wurde mithilfe von *random Hexamers* reverse transkribiert und die entstandene cDNA anschließend wie in 2.2.1.3 beschrieben durch eine PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz für die reverse Transkription enthielt 500 – 1000 ng RNA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1mM dNTPs, 1 U/µl RNase Inhibitor, 2,5 U/µl Reverse Transkriptase und 2,5 µM *random Hexamere* in 1 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3) bei einem Endvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde anschließend in einem Thermocycler in drei Schritten reverse transkribiert: 10 min *random Hexamer* Annealing bei 21 °C, 15 min reverse Transkription bei 42 °C, 5 min Denaturierung bei 99 °C.

Zum Ausschluss einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA wurde zu jedem RT-Ansatz noch jeweils ein Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase sowie ein Reaktionsansatz ohne RNA durchgeführt. Zusätzlich wurde jede durch eine RT-PCR erhaltene cDNA mit Primern für Exon 4 und 5 des *β-Actin*-Gens durchgeführt (Primersequenzen siehe Anhang Seite 105). Diese Primer sind intronüberspannend konzipiert, so dass bei Reinheit der RNA nur ein Produkt erhalten wird. Bei Kontamination der RNA mit genomischer DNA entsteht noch ein weiteres, größeres Produkt.

#### 2.2.2.4 Allelspezifische Genexpressionsanalyse

Für die allelspezifische Genexpressionsanalyse wurde eine RT-Reaktion an ca. 300 ng RNA eines Patienten und anschließend eine PCR mit cDNA-spezifischen Primern durchgeführt (siehe 2.2.2.3). An ca. 100 ng DNA des Patienten erfolgte ebenfalls eine PCR-Analyse mit DNA-spezifischen Primern (siehe 2.2.1.3). Der 3'-Primer konnte für beide Reaktionen

benutzt werden und hatte an seinem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (6-FAM™) gebunden. Die PCR-Produkte wurden mit dem ABIprism 3100 Genetic Analyzer und der *GeneScan™* Analyse Software sowie dem Programm *Genotyper* (Applied Biosystems) analysiert.

#### **2.2.2.5 Amplifikation von cDNA-Enden (5'RACE)**

Bei der Methode der RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) werden an einer mRNA die Sequenzabschnitte zwischen der bekannten internen Sequenz und dem unbekannten 5' bzw. 3' Ende amplifiziert (Frohmann *et al.*, 1993; Ohara *et al.*, 1989). Zunächst wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und dann erfolgt im Falle der 5'RACE das Poly(A)-Tailing mit Hilfe der Terminalen Transferase (Roche). Hierbei wird an das 3' Ende der cDNA ein Poly(A)-Schwanz angehängt. Dadurch können die Enden der mRNA in einer PCR mit einem spezifischen Primer für den Poly(A)-Schwanz (Oligo(dT)-anchor primer) und einem genspezifischen Primer amplifiziert werden. Für die RACE wurde das 5'/3' RACE Kit (2nd Generation, Roche) verwendet. Es wurde – außer dem ersten Schritt – nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für die cDNA Synthese (erster Schritt) wurde das Protokoll des Herstellers modifiziert. Es wurde ein eigener RT-Ansatz erstellt bzw. verwendet (siehe 2.2.2.3).

### **2.2.3 Bakterien**

#### **2.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

Bakterienzellen, die DNA aus der sie umgebenden Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen), wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis *et al.*, 1982) hergestellt. Eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes DH5α wurde in 10 ml b-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Trypton, 5 g MgSO<sub>4</sub>, pH 7,6, mit KOH eingestellt) bei 37 °C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ml b-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen eines OD<sub>550</sub>-Wertes von 0,48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 15 min



bei 1250 x g und 4 °C sedimentiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TfbI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 5,8, mit 0.2 M HAc eingestellt) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Zellen erneut für 15 min bei 1250 x g und 4 °C sedimentiert und das Pellet in 1 ml kaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 6,5, mit KOH eingestellt) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien**

5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1 – 10 ng Plasmid-DNA wurden zu 50 µl kompetenten Bakterienzellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 2 min bei 42 °C, dann wurde der Ansatz 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit einem Antibiotikum entsprechend des Selektionsmarkers des Plasmids ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.4 Zellkultur**

##### **2.2.4.1 Kultivierung der Zellen**

Alle Säugerzelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C, unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor der Benutzung sterilisiert.

##### **2.2.4.2 Passagieren von Zellen**

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von ca.  $10 \times 10^6$  Zellen pro Zellkulturflasche (Nunc, 75 cm<sup>2</sup>) geerntet. Das Kulturmedium wurde von den adhärent wachsenden Zellen vollständig abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch eine 3 – 5-minütige

Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde in einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen pro Flasche zur weiteren Kultivierung auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

#### **2.2.4.3 Transiente Transfektion von Zellen**

Die Transfektion von Zellen erfolgte mittels FuGENE HD (Roche). Hierzu wurden das entsprechende Plasmid in 100  $\mu$ l Opti-MEM Medium ohne FKS verdünnt und anschließend mit der dreifachen Menge (v/v) an FuGENE HD, bezogen auf die Menge der zu transfizierenden DNA versetzt. Nach 20 – 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tröpfchenweise auf Zellen gegeben, die entweder in 12-well-Platten auf Deckgläschen oder in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert waren, und für 48 h unter Standardbedingungen inkubiert.

#### **2.2.4.4 Immunfluoreszenz**

Für Immunfluoreszenzstudien wurden  $3 - 5 \times 10^4$  Zellen (Hela oder HEK293) pro well (12-well-Platte) auf runde Objektträgergläschen ( $\varnothing$  15 mm) ausgesät und 24 h später mit 1  $\mu$ g DNA transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 10 min mit Methanol fixiert. Im Anschluss daran wurden die fixierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 30 min mit Immunfluoreszenz-Puffer (I-Puffer) äquilibriert und eine Stunde mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (1:150) in 200  $\mu$ l I-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit I-Puffer wurden die Zellen mit einem entsprechenden Zweit-Antikörper (1:200) in 200  $\mu$ l I-Puffer für eine Stunde inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit I-Puffer wurde die Kern-DNA mit DAPI (200  $\mu$ g/ml; 1:200 in 200  $\mu$ l I-Puffer) gefärbt (30 min). Zur Konservierung wurden die Präparate mit dem Prolong Antifade Kit (Molecular Probes) eingedeckelt.

Immunfluoreszenz-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,05
	100 mM	NaCl
	0,05 %	Tween 20
	0,5 %	BSA (Fraktion V)

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM-Mikroskop, Carl-Zeiss) verwendet.

## **2.2.5 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.2.5.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen**

Die Gewinnung von Gesamtzell-Proteinextrakten erfolgte durch die Aufnahme adhärent gewachsener Zellen in eiskaltem PBS, die mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgelöst wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (175 x g, 5 min) sedimentiert und in *Whole-Cell-Extract*-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde eine Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschall-Desintegrator mit 3 mm Mikrospitze durchgeführt (Gesamtzeit 10 s, Einschaltdauer 50 %, Ausgangsleistung 30 %). Nach Sedimentierung aller unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation wurde aus dem Überstand mit 3,3 µl eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (nach Bradford, siehe 2.2.5.3).

<i>Whole-Cell-Extract</i> -Puffer:	30 mM	Tris-HCL, pH 8
	0,42 M	NaCl
	0,5 mM	EDTA
	20 %	Glycerol
	Proteaseinhibitoren (Pierce) hinzufügen	

### **2.2.5.2 Gesamtproteinextraktion aus Gewebe**

Die Gewinnung von Gesamtproteinextrakt aus Gewebe erfolgte an frischem oder tiefgefrorenen (-80 °C) humanen Gewebe. Das Gewebe wurde zunächst mit einem Skalpell

zerkleinert und anschließend mit einem Cellstrainer eine Einzelzellsuspension in PBS angefertigt. Erythrozyten wurden mit einer 5-minütigen Inkubation in Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma) lysiert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (175 x g, 5 min) sedimentiert und in *Whole-Cell-Extract*-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde eine Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschall-Desintegrator mit 3 mm Mikrospitze (Gesamtzeit 10 s, Einschaltdauer 50 %, Ausgangsleistung 30 %) durchgeführt. Nach Sedimentierung aller unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation wurde aus dem Überstand mit 3,3 µl eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (nach Bradford, siehe 2.2.5.3).

#### **2.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (Bradford, 1976)**

Es wurden jeweils 1 ml Bradford Reagenz (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) mit 3,3 µl Proteinlösung versetzt, 5 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm im Photometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) gemessen. Parallel wurde auf gleiche Weise eine Eichkurve erstellt (BSA in H<sub>2</sub>O). Mit Hilfe dieser Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der unbekannten Lösung bestimmt werden.

#### **2.2.5.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)**

Für eine Analyse durch SDS-PAGE wurden die Proteine in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (7,5 – 10 %, je nach Größe der Proteine) elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur (BIO-RAD) aufgetrennt. Es wurden pro Spur 20 µg Protein des Gesamtproteinextraktes aus kultivierten Zellen und 40 µg Protein des Gesamtproteinextraktes aus Gewebe mit 4x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C denaturiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und in 1x SDS-Laufpuffer bei 15 – 20 mA für 2 – 4 h aufgetrennt. Für den immunologischen Nachweis wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran transferiert.

10 % APS-Lösung:	10 %	Ammoniumpersulfat
Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4 %	SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 %	SDS
10x SDS-Laufpuffer:	1,25 M	Tris-Base
	2 M	Glycin
	1 %	SDS
4x SDS-Probenpuffer:	62 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 %	SDS
	10 %	Glycerin
	5 %	DTT
	5 %	β-Mercaptoethanol
	0,025 %	Bromphenolblau
Rotiphoese Gel30:	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bisacrylamid

#### 2.2.5.5 Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot)

Zum Transfer von Proteinen auf Nylonmembranen wurde das Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der Firma BIO-RAD) angewendet. Dazu wurde auf der (Graphit)-Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: Ein Whatman-Papier (extra thick Blot Paper Protean XL size, BIO-RAD), eine Hybond C Membran (Amersham), Proteingel und abschließend ein weiteres Whatman-Papier (alle Komponenten mit Transfer-Puffer angefeuchtet). Es wurde 1,5 h bei 20 Volt transferiert. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran mit einer Ponceau-Lösung angefärbt und anschließend mit TBS-T wieder entfärbt. Zum Nachweis der Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung

abgesättigt (Inkubationszeit 1 h bei RT). Anschließend wurde der Blot mit dem 1. Antikörper in Blockierlösung für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Der anti-C15orf2-Antikörper wurde hierbei 1:5000, der anti-FLAG-Antikörper 1:2500 in Blockierlösung eingesetzt. Die Membran wurde 3x mit TBS-T gewaschen und für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper (1:1000 in Blockierlösung) bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBS-T wurde der Western-Blot entwickelt. Hierzu wurde das Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) verwendet. Der Blot wurde anschließend für 5 min in der aktivierten Entwicklerlösung geschwenkt und anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein Röntgenfilm (Super RX, Fuji) wurde aufgelegt und nach einer Expositionszeit von 30 sec bis 5 min entwickelt.

Transfer-Puffer:	5,82 g/l	Tris-Base
	2,93 g/l	Glycin
	3,75 ml	10 % SDS
	200 ml	Methanol
	ad 1000 ml bidest Wasser	

TBS-T:	1,21 g/l	Tris-Base
	8,77 g/l	NaCl
	ad 1000 ml bidest Wasser	
	500 µl Tween-20 hinzufügen	

Blockierlösung:	5 %	Magermilchpulver
	in TBS-T	

## 2.2.6 Statistische Analyse

Die Haplotyp-Blockstruktur wurde mit Hilfe der Software Haploview (Barrett *et al.*, 2005) untersucht. Paarweises Kopplungsungleichgewicht zwischen den Polymorphismen wird als D' (ein normalisierter Wert, um die Stärke des Kopplungsungleichgewichts zu beurteilen) ausgedrückt. Haplotyp-Blöcke wurden mit dem 4-Gameten Regel Algorithmus berechnet.

Die Beziehung zwischen den SNPs von *C15orf2* wurde mit der Software Network 4.510 (<http://www.fluxus-engineering.com>) bestimmt, wobei der Median Joining Algorithmus (Bandelt *et al.*, 1999) verwendet wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expressions- und Methylierungsanalysen in der PWS-kritischen Genregion sowie epigenetisch relevanter Gene

Die PWS-kritische Region auf Chromosom 15, 15q11q13, unterliegt dem genomischen Imprinting. Mehrere der dort lokalisierten Gene werden ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert, dazu zählen die Gene *MAKORIN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, *SNURF-SNRPN* sowie die *SNORD*-Gene in den Introns von *SNURF-SNRPN*. *SNURF-SNRPN* ist ein bicistronisches Gen. Es teilt sich auf in die ursprünglich entdeckten 10 proteincodierenden Exons (Özcelik *et al.*, 1992) und in die sogenannten *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte. Die Funktion dieser Transkripte ist noch nicht vollständig geklärt, möglicherweise sind sie in der Imprint-Umschaltung in der Keimbahn involviert (Dittrich *et al.*, 1996).

Kürzlich wurden zwei weitere Gene in dieser Region zwischen *NECDIN* und *SNURF-SNRPN* identifiziert, *PWRN1* und *C15orf2*. Es konnte gezeigt werden, dass beide Gene im fetalen Gehirn monoallelisch exprimiert werden (Buiting *et al.*, 2007). Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, von welchem elterlichen Allel die Expression erfolgt. Die monoallelische Expression lässt aber eine Bedeutung für den PWS-Phänotyp vermuten.

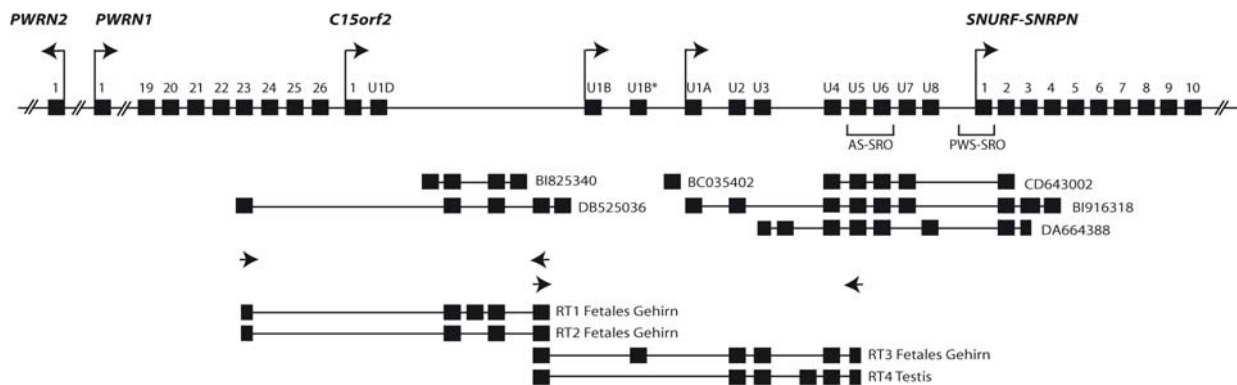
Im Verlauf dieser Arbeit sollten weitere Analysen bezüglich der Expression von *PWRN1* und *C15orf2* sowie der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte erfolgen.

##### 3.1.1 *PWRN1* ist Teil der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit

Bei der Durchführung einer Datenbankanalyse, unter Verwendung des NCBI Browsers (NCBI, build 36.1), zur Identifizierung neuer putativer Transkripte in der chromosomalen Region 15q11q13, fielen zwei EST-Klone centromerisch von *SNURF-SNRPN* auf, DB525036 und BI825340 (Abbildung 3.1). DB525036 wurde aus einer testisspezifischen cDNA-Bank isoliert, BI825340 aus einer knochenmarksspezifischen cDNA-Bank. Beide EST-Klone sind gespleißt, DB525036 besteht aus insgesamt fünf Exons, BI825340 aus vier Exons, wobei beide EST-Klone zwei identische Exons besitzen. BI825340 enthält jedoch zusätzlich noch zwei Exons, die in Introns von DB525036 liegen. Eine Sequenzanalyse zeigte, dass das am weitesten centromerisch gelegene Exon von DB525036 das Exon 23 von *PWRN1* repräsentiert. Die Exons 24-26 von *PWRN1* sind in DB525036 nicht enthalten, jedoch besitzt



der EST-Klon noch vier zusätzliche Exons, die telomerisch des Exons 26 liegen. Diese repräsentieren somit einen neuen alternativen 3'Bereich von *PWRN1*. Die Exons von DB525036 überspannen das Gen *C15orf2*, welches somit in einem Intron von *PWRN1* liegt. Zur Verifizierung dieser EST-Klone und somit weiterer Downstream-Exons von *PWRN1* wurde eine *Exon-Connection-PCR* an cDNA aus fetalem Gehirn durchgeführt. Hierbei wurden Primer in Exon 23 von *PWRN1* und dem vorletzten centromerisch gelegenen Exon von DB525036 gelegt, die PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T Easy inseriert und anschließend sequenziert. Bis auf die beiden außen gelegenen Exons von BI825340 konnten in zwei erhaltenen RT-Klonen alle Exons der beiden EST-Klone in fetalem Gehirn nachgewiesen werden (Abbildung 3.1, RT1 und RT2). Zusätzlich konnte auch ein neues alternatives Exon im Intron zwischen dem zweiten und dritten Exon beider EST-Klone identifiziert werden (RT1, Sequenz siehe Abbildung 3.2A).



**Abbildung 3.1 Genomische Organisation der Region von *PWRN1* bis *SNURF-SNRPN* auf Chromosom 15**

Die einzelnen Exons sind als schwarze Kästchen dargestellt, von ihnen abgehende Pfeile kennzeichnen bekannte Transkriptionsstartpunkte. AS-SRO und PWS-SRO stellen die beiden Teile des Imprinting Centers dar. *U6*, *U7* und *U8* sind unpublizierte *SNURF-SNRPN* Upstream-Exons (*U6*: Chromosom 15 22.717.397 – 22.717.495, *U7*: Chromosom 15 22.725.258 – 22.725.314, *U8*: Chromosom 15 22.746.815 – 22.746.930, mündliche Mitteilung K. Buiting). Darunter sind schematisch die bekannten EST-Klone für diese Region dargestellt, sowie die bei der *Exon Connection-PCR* erhaltenen RT-Klone. Die Lage der verwendeten Primer ist mit Pfeilspitzen gekennzeichnet (Abbildung nicht maßstabsgetreu).

Das am weitesten telomerisch gelegene Exon von DB525036 endet nur 285 bp von dem *SNURF-SNRPN* Upstream-Exon *UIB* entfernt, das eines der zwei alternativen Transkriptionsstartpunkte der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte repräsentiert. Da *PWRN1* ein ähnlich komplexes Spleißmuster zeigt wie *SNURF-SNRPN*, wurde untersucht, ob *PWRN1* Bestandteil der komplexen *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit ist. Dazu wurde eine *Exon-Connection-PCR* an cDNA aus fetalem Gehirn und Testis durchgeführt. Hierfür wurde

ein Primer in das vorletzte centromerisch gelegene Exon von DB525036 gelegt und der zweite Primer in das Upstream-Exon *U5* von *SNURF-SNRPN*. In beiden Geweben wurde jeweils ein RT-PCR-Produkt erhalten, das das Upstream-Exon *U5* mit dem EST-Klon verbindet. Das RT-PCR-Produkt aus fetalem Gehirn enthält zusätzlich noch die Upstream-Exons *UIB\**, *U2*, *U3* und *U4*, der RT-Klon aus Testis die Upstream-Exons *U2*, *U3*, *U4* sowie ein weiteres, bislang unbekanntes Exon dieser Transkriptionseinheit zwischen den Upstream-Exons *U3* und *U4* (RT4, Sequenz siehe Abbildung 3.2B).

Somit konnte gezeigt werden, dass *PWRN1* ein Teil der *IC-SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit darstellt.

#### A

```
.....gtattagAACCTGACACCATTATTCATAATTTCACTGTATATGAAGAGCAACCCTATAC
TCCATACAAACAACATAGACTGTGGAATTATGTTGTGAAATGTAAAGAGAAGATGATT
CCCAAATTTAAAGGAAACTGGAGGTGTTCTGGAGAAACAAATAGAGgtggtta.....
```

#### B

```
.....tttacagGGTGCTGATTGGTCCATTTTACAAACCTCTAGCTACAGAGCATCGATTGGTGC
ATTTTACAGAGCACTGATTGGTGCATTTTACAAACCTGTTGTAAGACAGAAAAGTTCT
CCAAGGCCCCACCTGACCTACGAAGTCCAGGTGGCTTCATCTCTCAGAATCAGCTTTTA
AAGGCCATAAATTTCCAGgtaagta.....
```

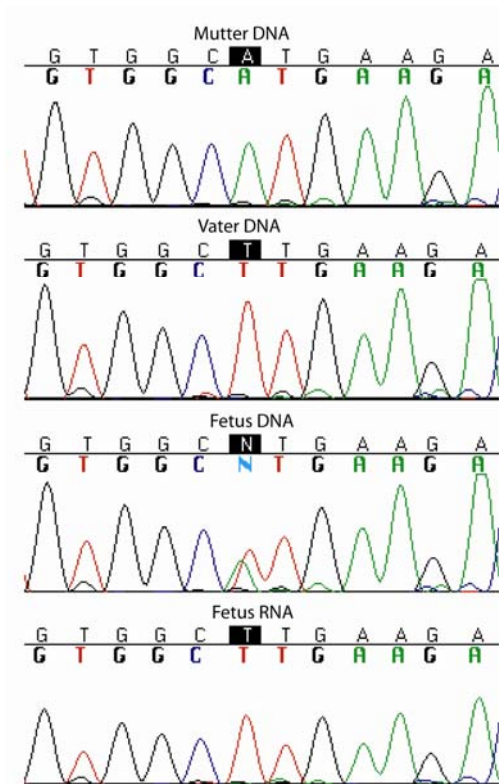
### Abbildung 3.2 DNA-Sequenzen der neu identifizierten Upstream-Exons von *SNURF-SNRPN*

Exonsequenzen sind großgeschrieben, Ausschnitte der Sequenzen der umgebenden Introns klein. A) Sequenz des neu identifizierten Upstream-Exons zwischen *UID* und *UIB* (Chromosom15: 25,056,210-25,056,365, UCSC Browser, hg19), identifiziert in fetaler Gehirn cDNA. B) Sequenz des neu identifizierten Upstream-Exons zwischen *U3* und *U4* (Chromosom15: 25,162,198-25,162,386, UCSC Browser, hg19), identifiziert in Testis cDNA.

#### 3.1.2 *PWRN1* wird in fetalem Gehirn paternal exprimiert

Buiting *et al.*, (2007) konnten zeigen, dass *PWRN1* in fetalem Gehirn eine monoallelische Expression aufzeigt, während es in Testisgewebe biallelisch exprimiert wird. Aufgrund des Fehlens geeigneter fetaler und entsprechender elterlicher RNA- sowie DNA-Proben konnte bislang jedoch keine Aussage über das elterliche Allel getroffen werden, von dem die Expression erfolgt. Durch die Anbindung an die *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit lag die Vermutung nahe, dass *PWRN1* ebenfalls vom paternalen Allel exprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun geeignetes Probenmaterial aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Essen erhalten und analysiert werden. DNA aus fetalem Gehirn sowie

aus Blutproben der Eltern wurde hinsichtlich des SNPs (*single nucleotide polymorphism*) rs12908526 (A/T) im Exon 26 von *PWRN1* genotypisiert. Dazu wurde der entsprechende Bereich mittels einer PCR amplifiziert und das erhaltene Produkt anschließend sequenziert. Die verwendeten Primer sind im Anhang auf Seite 103 aufgeführt. Die mütterliche DNA zeigte eine Homozygotie des SNPs hinsichtlich des Nukleotides Adenin auf, die väterliche DNA eine Homozygotie hinsichtlich des Nukleotides Thymin (siehe Abbildung 3.3). Für die fetale DNA konnte eine Heterozygotie nachgewiesen werden. Mittels einer RT-PCR an der RNA aus dem fetalem Gehirn und anschließender Genotypisierung des SNPs konnte nur noch das Thymin-Allel detektiert werden. Somit erfolgt die monoallelische Expression von *PWRN1* wie erwartet von dem väterlichen Allel.



**Abbildung 3.3 Paternale Expression von *PWRN1***

Das Chromatogramm der Sequenzanalyse für den SNP rs12908526 in Exon 26 von *PWRN1* zeigt deutlich die Homozygotie in der mütterlichen und väterlichen DNA für das A- bzw. das T-Allel. In der DNA aus fetalem Gehirn können beide Allele nachgewiesen werden, in der entsprechenden RNA nur das vom Vater ererbte T-Allel.

### 3.1.3 Expressionsprofile der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit und weiterer epigenetisch relevanter Gene in verschiedenen Stadien der Spermatogenese

Um das Verhalten der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte in der männlichen Keimbahn näher zu untersuchen und um eventuelle epigenetische Faktoren zu identifizieren, die in der Keimzellentwicklung involviert sein könnten, wurden Genexpressionsdaten analysiert, die aus Testisbiopsaten von fertilen Männern sowie von Männern mit unterschiedlich starker

Ausprägung von Störungen in der Spermatogenese erstellt wurden. Diese Daten wurden von Andrej-Nikolai Spiess aus dem Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array GeneChips erstellt (Spiess *et al.*, 2007) und uns zur Verfügung gestellt. Mit diesen GeneChip Arrays ist es möglich, die Expression von über 47.000 Transkripten im humanen Genom zu untersuchen.

Die Störungen in der Spermatogenese der analysierten Patienten äußern sich in einer vorzeitigen Arretierung der Keimzellentwicklung und somit in einem unterschiedlichen Gehalt an Keimzellen in den verschiedenen Stadien, der abhängig von dem Arretierungszeitpunkt ist. Die Daten der Affymetrix GeneChip Arrays wurden verwendet, um Gene zu identifizieren, die in höheren Keimzellentwicklungsstufen exprimiert werden.

Im Detail wurden Patienten mit folgenden Arretierungsstadien der Spermatogenese untersucht:

- CTA → komplette tubuläre Atrophie (n=1)
- SCO → ausschließliches Vorhandensein von Sertoli-Zellen (n=7)
- PMA → prämeiotische Arretierung der Spermatogenese (n=3)
- MA → Meiotische Arretierung der Spermatogenese (n=5)
- RS → Vorkommen von runden Spermatiden (n=4)
- HYS → Hypospermatogenese (n=7)
- FS → normale Spermatogenese (n=8)

Die SONDENSETS der Gene, die untersucht werden sollten, wurden zunächst über eine Datenbanksuche (UCSC Browser, hg18, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) identifiziert und die jeweilige Zielsequenz der Sonden nochmals über einen Datenbankvergleich verifiziert, um sicherzugehen, dass die SONDENSETS tatsächlich das gewünschte Gen detektieren. SONDENSETS, deren Zielsequenz in den Introns der analysierten Gene liegen, wurden dabei von einer weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Expressionsdaten der in Exons gelegenen SONDENSETS wurden anschließend analysiert und in einer Heatmap-Darstellung graphisch dargestellt (Abbildung 3.4).

Um zu überprüfen, ob die GeneChip Daten verwendet werden können, um eine vermehrte Expression von Genen an unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese zu detektieren, wurden zunächst Gene untersucht, von denen bekannt ist, dass sie in der Spermatogenese eine Rolle spielen.

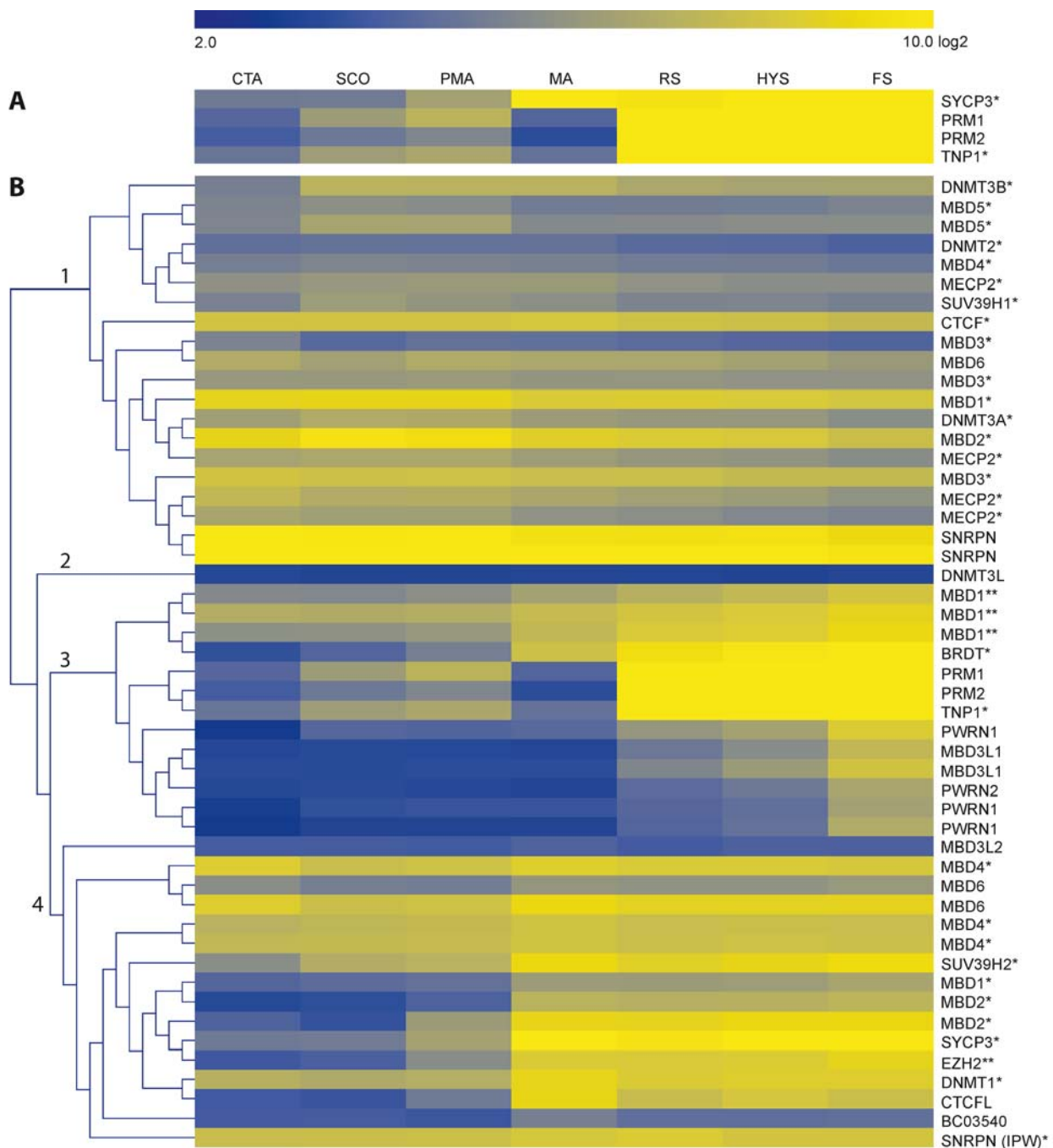
Das Gen *SYCP3* (*synaptonemal complex protein 3*) ist in die Paarung der homologen Chromosomen während der Meiose I involviert. Wie in der Abbildung 3.4A sichtbar, erfolgt

eine vermehrte Expression mit einem Anstieg der Keimzellen während der Meiose. Es konnte nur eine geringe Expression in Testisbiopsaten von Männern detektiert werden, die eine Arretierung der Spermatogenese vor der Meiose (PMA) aufwiesen, während eine hohe Expression in Testisbiopsaten von Männern detektiert werden konnte, die eine Arretierung der Spermatogenese in den darauffolgenden Stadien besaßen (MA, RS, HYS) oder eine normale Spermatogenese (FS) aufwiesen. Das Gen *TNPI* (*transition protein 1*) ist wie die beiden Protamine *PRM1* und *PRM2* für die Verpackung der DNA nach der Meiose in den Zellkern der Spermien verantwortlich. Diese Gene konnten erwartungsgemäß in einem hohen Maße nur in Testisbiopsaten von Männern nachgewiesen werden, die eine Arretierung der Spermatogenese nach der Meiose aufwiesen.

Diese Ergebnisse der in der Spermatogenese involvierten Gene zeigen, dass die Daten dazu verwendet werden können, die quantitative Expression von Genen in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese sichtbar zu machen. In nachfolgenden Analysen wurde die Expression der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte sowie von Genen, die DNA- und histonbindende sowie DNA- und histonmodifizierende Eigenschaften besitzen und somit epigenetisch relevant sind. Manche dieser Gene werden durch mehrere in Exons liegenden SONDENSETS detektiert. In einigen Fällen detektieren die SONDENSETS aber auch unterschiedliche Spleißformen eines Gens.

Die Expression der untersuchten Gene wurden durch eine hierarchische Clusteranalyse (Abbildung 3.4B) in Clustern von Genen, die ein ähnliches Expressionsmuster zeigten, zusammengefasst. Dazu wurden die gemittelten Expressionswerte der Gene innerhalb der untersuchten Gruppen mit unterschiedlichen Arretierungszeitpunkten in der Spermatogenese von A. Spieß mit der TIGR MeV Software v4.3 (The TIGR Consortium, <http://www.tm4.org/mev.html>) ausgewertet.

Insgesamt konnten vier Cluster identifiziert werden. Cluster 1 beinhaltet Gene mit geringen Unterschieden in der Expressionsstärke in den jeweiligen Stadien (*DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MBD3*, *MBD3L2*, *MBD4*, *MBD5*, *MBD6*, *MECP2*, *SUV39H1*, *CTCF*, und Isoformen von *MBD1* und *MBD2*). Einige der Gene (*MBD5*, *MBD4*, *SUV39H1*, *DNMT3A* und *MECP2*) scheinen zu einem geringeren Anteil in Testis von Männern exprimiert zu werden, die eine Arretierung zu einem späten Spermatogenesestadium oder eine normale Spermatogenese aufweisen. Dies weist bedingt durch einen höheren Anteil von Keimzellen bei diesen Männern auf eine Expression in somatischen Zellen hin.



**Abbildung 3.4: Heatmap Darstellung der gemittelten Expressionswerte von ausgewählten Genen in Testis von Männern mit unterschiedlichen Störungen während der Spermatogenese**

Die Expressionswerte wurden durch eine Analyse mit Affymetrix GeneChip Arrays erhalten. Die analysierten Gruppen von Männern mit Störungen in der Spermatogenese sind: CTA (komplette tubuläre Atrophie, n=1), SCO (Vorhandensein von Sertoli-Zellen, n=7), PMA (prämeiotische Arretierung der Spermatogenese, n=3), MA (Meiotische Arretierung der Spermatogenese, n=5), RS (Vorkommen von runden Spermatiden, n=4), HYS (Hypospermatogenese, n=7), FS (normale Spermatogenese, n=8). Dunkelblau indiziert keine Expression ( $\log_2=2$ ), gelb eine hohe Expression ( $\log_2=10$ ). A) Expression von vier in der Spermatogenese involvierten Genen. B) Die hierarchische Clusteranalyse der analysierten Gene ergab vier Cluster mit Gruppen von Genen unterschiedlichen Expressionsverhaltens, wobei manche Gene in der Analyse durch mehrere SONDENSSETS auf dem Array dargestellt werden. Die Expressionsmuster von Genen, welche mit einem Sternchen gekennzeichnet sind, konnten durch ein weiteres Microarray-System (Codelink System, siehe Text) verifiziert werden. Gene, die mit zwei Sternchen gekennzeichnet sind, zeigten unterschiedliche Expressionsmuster in den beiden Systemen (erstellt mit freundlicher Unterstützung von A. Spieß, Hamburg).

Das Cluster 2 beinhaltet nur ein einziges Gen (*DNMT3L*), bei dem keine Expression detektiert werden konnte.

Das Cluster 3 enthält Gene, die hauptsächlich in Keimzellen exprimiert sind und eine vermehrte Expression in der späten Meiose oder nach der Meiose aufweisen. Dazu gehören die Spermatogenesegene *TNP1*, *PRM1* und *PRM*, sowie die Gene *MBD1*, *MBD3L1*, *BRDT*, *PWRN2* und *PWRN1*.

Das Cluster 4 ist relativ heterogen. Die Expression der meisten dieser Gene wird vor oder während der frühen Meiose hochreguliert. Dieses Cluster beinhaltet das Spermatogenesegen *SYCP3*, sowie die Gene *DNMT1*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD4*, *MBD6*, *SUV39H2*, *EZH2*, *CTCF* und ein *IC-SNURF-SNURP*-Transkript. Bei den epigenetisch relevanten Genen in diesem Cluster wird die Expression von *MBD2*, *EZH2*, *SUV39H2* und *CTCF* vor der Meiose hochreguliert. Dies zeigt, dass die Expression dieser Gene keimzellspezifisch ist. Eine detaillierte Analyse der Histon Methyltransferase Gene *SUV39H1*, *SUV39H2* und *EZH2* ist in der Abbildung 3.5A dargestellt. In der Abbildung kann man deutlich erkennen, dass die Expression von *EZH2* und *SUV39H2* während der Meiose hochreguliert wird, wohingegen die Expression von *SUV39H1* während der Spermatogenese leicht abfällt. Dies deutet darauf hin, dass es hauptsächlich in somatischen Zellen exprimiert wird.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden von A. Spieß die Expressionsdaten der Gene mit Daten verglichen, die durch eine unabhängige Analyse mit einem anderen Arraysystem, einer Single-Oligonukleotid basierte Microarray Plattform (Codelink™ Human 20K Bioarray, GE Healthcare) erhalten wurden (Feig *et al.*, 2006). Dieser Vergleich bestätigte das mit den GeneChips detektierte Expressionsverhalten bei 16 von 18 untersuchten Genen (die entsprechenden Gene sind mit Sternchen in der Abbildung 3.4B markiert).

Die Gene *MBD1*, *MBD2* und das *IC-SNURF-SNRPN*-Transkript sind durch verschiedene SONDENSSETS auf dem Array repräsentiert, die unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Die detaillierten Expressionsmuster von *MBD1* und *MBD2* und die genaue Lage der entsprechenden SONDENSSETS sind in der Abbildung 3.5B und 3.5C dargestellt. Beide Gene werden in allen Biopsaten exprimiert. Es konnte jedoch bei der Analyse durch einen Anstieg der Expression während der Meiose, die nur durch bestimmte SONDENSSETS detektiert werden konnte, festgestellt werden, dass testisspezifische Isoformen von *MBD1* und *MBD2* exprimiert werden, die alternative 3'Exons aufweisen. Die testisspezifische Isoform von *MBD2* stellt eine trunkierte Form des eigentlichen Proteins dar. Während die Expression dieser Isoform vor der Meiose (PMA) ansteigt, kommt es zu einem Abfall der Expression des







In der Abbildung 4D ist die detaillierte Expression der Gene *PWRN1* und *PWRN2*, sowie der mRNA BC035402 dargestellt. Diese mRNA liegt einem Intron der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit und repräsentiert kein bislang bekanntes Upstream-Exon (Abbildung 3.1). Aus der Abbildung 4D wird ersichtlich, dass *PWRN1* und *PWRN2* nach der Meiose vermehrt exprimiert werden, während BC035402 bereits während der Meiose hochreguliert wird.

### 3.1.4 Analyse der mRNA BC035402

Bei der Analyse der Expression der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte mittels Affymetrix GeneChips (siehe 3.1.3) fiel ein Sondenset auf, das die 3909 bp große mRNA BC035402 detektiert. Diese ist durch einen cDNA-Klon repräsentiert, der aus einer Testis cDNA-Bank isoliert wurde. Die exprimierte Sequenz liegt im Intron zwischen den alternativen *SNURF-SNRPN*-Transkriptionsstartpunkten *UIB* und *UIA* (siehe Abbildung 3.1) und zeigt ein anderes Expressionsverhalten als die zur *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit gehörenden Transkripte. Um die Expression dieser mRNA zu verifizieren, wurden ein Vorwärtsprimer am Anfang der annotierten Sequenz, sowie zwei Rückwärtsprimer, einer innerhalb und einer am Ende der Sequenz gelegt (Sequenzen der Primer siehe Anhang Seite 103, Positionen siehe Abbildung 3.6) und eine RT-PCR an Testis cDNA durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden über Microcon-Säulen aufgereinigt, in den Vektor pGEM-T Easy inseriert und sequenziert. Obwohl die mRNA laut Datenbank (UCSC Browser hg18, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) als kolinear mit der genomischen Sequenz annotiert ist, konnte dies nicht verifiziert werden. Es wurden zwei alternative gespleißte Transkripte identifiziert, die ein unterschiedliches Muster aus Exons und Introns aufzeigten (Abbildung 3.6), wobei ein Transkript drei Exons und das andere zwei Exons enthält.

Zur Klärung, ob die mRNA ein weiteres, bislang unbekanntes, Exon der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit darstellt oder ein unabhängiges Transkript repräsentiert, wurde versucht, eine *Exon-Connection*-PCR der mRNA und den *SNURF-SNRPN* Upstream-Exons *U2*, *U3*, *U5*, *UIB*, dem Exon 23 von *PWRN1* sowie dem vorletzten telomerisch gelegenen Exon des EST-Klons DB525036 durchgeführt. Als Template DNA wurde cDNA aus Testis verwendet, da der ursprüngliche cDNA-Klon aus einer aus Testis generierten cDNA-Bank stammt, sowie cDNA aus fetalem Gehirn. Es konnte jedoch kein Produkt generiert werden.

In einem zweiten Ansatz wurde mittels 5'RACE versucht, BC035402 in 5'Richtung zu verlängern und es so an eines der Upstream-Exons anzubinden. Dazu wurden drei sequenzspezifische Primer (Sequenzen siehe Anhang Seite 103, Positionen siehe Abbildung 3.6) in die zuvor als exprimiert nachgewiesenen Sequenzen gelegt und die 5'RACE an Testis cDNA durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden über Microcon-Säulen aufgereinigt, in den Vektor pGEM-T Easy inseriert und sequenziert. In einem Klon konnte eine Verlängerung der annotierten Sequenz um sechs Nukleotide, die der vorausgehenden genomischen Sequenz entsprechen, in Richtung 5'Ende erreicht werden. Auf diesem Wege konnte jedoch BC035402 nicht an die *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit angebunden werden.



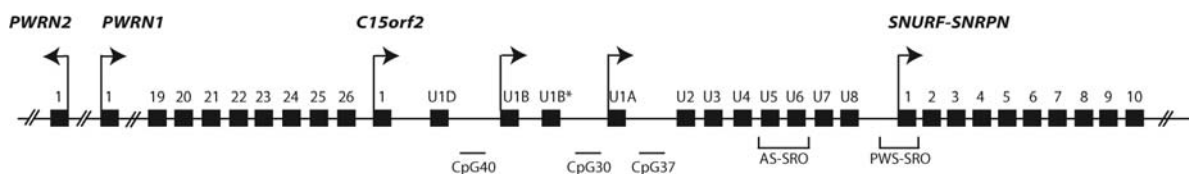
**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der identifizierten Exons der annotierten mRNA BC035402

Die Exons der beiden gefundenen Spleißvarianten sind jeweils in blau beziehungsweise grau dargestellt. Die Positionen der verwendeten Primer sind als schwarze Pfeile eingezeichnet. Die Positionen der verwendeten Primer für die 5'RACE-PCR sind als grüne Pfeile dargestellt (Darstellung nicht maßstabsgerecht).

### 3.1.5 Methylierungsanalysen neu identifizierter CpG-Islands innerhalb der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit

Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei CpG-Islands identifiziert (USCS-Browser, hg18), die innerhalb der Region der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit liegen. Das CpG40, zwischen *UID* und *UIB*, das CpG30 zwischen *UIB\** und *UIA* und das CpG 37, das zwischen *UIA* und *U2* lokalisiert ist (Abbildung 3.7). Die Namensgebung bezieht sich hierbei auf den UCSC-Browser, der die CpG-Islands nach der Anzahl der in ihnen enthaltenen CpG-Dinukleotide benennt. Die paternale Expression der Gene dieser Region wird über eine elternspezifische Methylierung sogenannter DMRs (differentiell methylierte Regionen) reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch diese CpG-Islands allelspezifisch methyliert sind und DMRs darstellen.

Die zu untersuchenden Bereiche wurden in PCR-Reaktionen an bisulfitbehandelter DNA amplifiziert und die erhaltenen Produkte anschließend in den Vektor pGEM-T Easy inseriert und sequenziert. Durch die Bisulfitbehandlung werden unmethylierte Cytosine zu Thyminen konvertiert, methylierte Cytosine verbleiben als Cytosine. Somit kann der Methylierungsstatus durch Sequenzierung des PCR-Produktes bestimmt werden. Die Analysen wurden an DNA aus peripheren Blutproben zweier Normalpersonen, an einer DNA aus Spermien und einer DNA aus fetalem Gehirn durchgeführt. Zusätzlich wurden jeweils ein PWS- und ein AS-Patient mit einer großen Deletion in der Region 15q11q13 untersucht, die aufgrund der Deletion jeweils nur ein Allel dieser Region besitzen.



**Abbildung 3.7 Schematische Übersicht über die Region von *PWRN1* bis *SNURF-SNRPN* auf Chromosom 15 mit Lokalisation von CpG40, CpG30 und CpG37**

Die einzelnen Exons sind als schwarze Kästchen dargestellt, von ihnen abgehende Pfeile kennzeichnen bekannte Transkriptionsstartpunkte. AS-SRO und PWS-SRO stellen die beiden Teile des Imprinting Centers dar. *U6*, *U7* und *U8* sind unpublizierte *SNURF-SNRPN* Upstream-Exons (*U6*: Chromosom 15 22.717.397 – 22.717.495, *U7*: Chromosom 15 22.725.258 – 22.725.314, *U8*: Chromosom 15 22.746.815 – 22.746.930, UCSC-Browser hg18, mündliche Mitteilung K. Buiting) (Abbildung nicht maßstabsgerecht).

### 3.1.5.1 Methylierungsstatus des CpG40

Das 359 bp große CpG-Island CpG40 ist 20 kb telomerisch von *UID* und 50 kb centromerisch von *UIB* lokalisiert (Abbildung 3.7) und enthält insgesamt 40 CpG-Dinukleotide, von denen 22 innerhalb eines 243 bp großen Bereichs untersucht wurden (Abbildung 3.8). Dazu wurde das PCR-Produkt wie in 3.1.5 beschrieben analysiert, die für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer sind im Anhang auf Seite 103 aufgeführt.

```

          1       2       3
CTGTAGGAAGGTCACATGACAGAGGGGAAGA1CGGTGGC2CGGCAGCAGC3CGATC
      4 5      6 7      8      9      10      11      12
CACTG4CGCGCCTG5CGCGGCTC6CGGTGG7CGTGAATGT8CGCTGGTCTCC9CGTCACCG10
      13      14      15      16      17
TTTCC11GTTTC12CGGG13CGAGTCTGTT14CGGCTTATGG15CGTCTGCTAGGAGTCTCCTATC
      18      19      20      21      22
CGGCG16TTTGTGC17CGCAGAAAACCTTTAACCTG18CGTTTACC19CGTAAACATTTTCCT20
      21      22
TTTtaggcttcctatcatTgTt

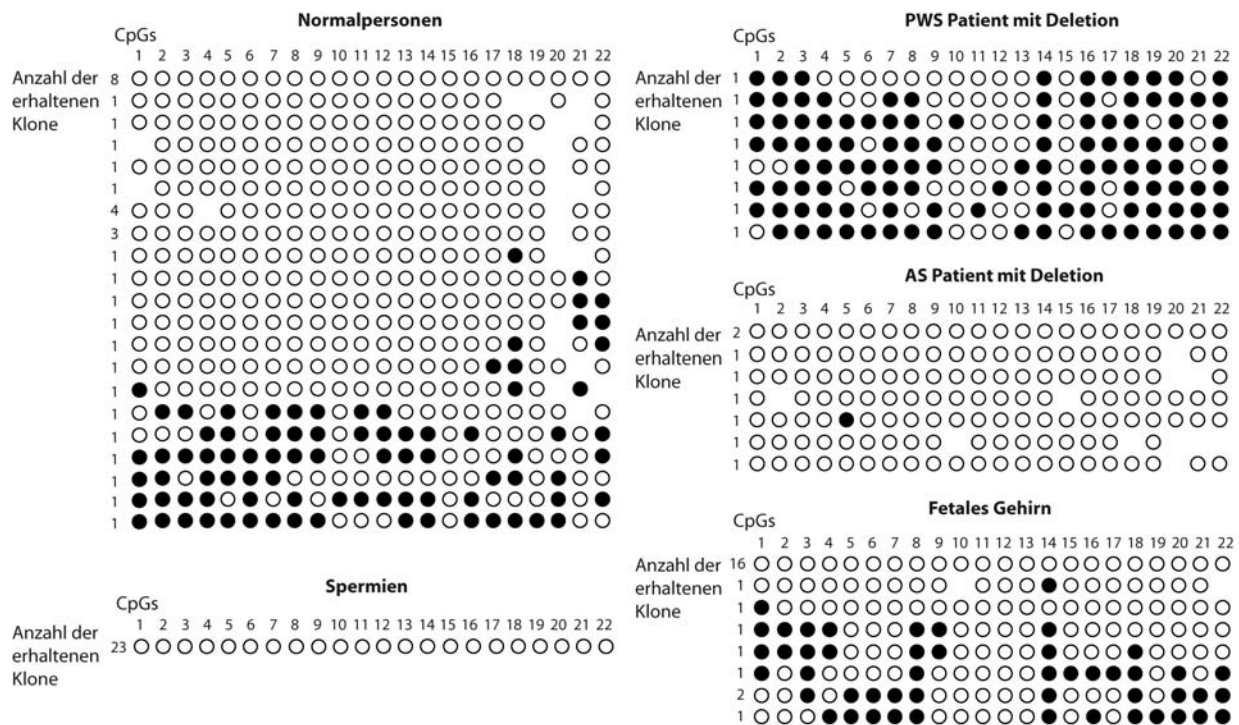
```

**Abbildung 3.8: Sequenzausschnitt des CpG-Islands CpG40, der in der Methylierungsanalyse untersucht wurde**

Die analysierten CpGs sind grau unterlegt und nummeriert. Die Lokalisation der Primer ist unterstrichen.

Es wurden insgesamt 33 Klone der beiden Normalpersonen sequenziert (Abbildung 3.9). Siebenundzwanzig Klone stammen von fast vollständig unmethylierten DNA-Sequenzen ab, nur im Bereich der CpGs 17-22 treten vereinzelt methylierte CpGs auf. Sechs der Klone stammen von DNA-Sequenzen ab, die teilweise methyliert waren. Die CpGs 10, 15 und 19 waren jeweils mit höchstens einer Ausnahme unmethyliert. Bei der Analyse des PWS-Patienten wurden überwiegend Klone erhalten, die von methylierten DNA-Sequenzen abstammen. Einzig im Bereich der CpGs 10-13 sowie des CpG 15 kommen vorwiegend unmethylierte CpGs vor. Bei den acht analysierten Klonen des AS-Patienten konnten nur Klone erhalten werden, die von vollständig unmethylierten DNA-Sequenzen abstammen. Diese Ergebnisse deuten auf eine tendenzielle Methylierung des maternalen Allels hin, während das paternale Allel vollständig unmethyliert vorliegt.

Alle 23 Klone aus Spermien-DNA repräsentieren vollständig unmethylierte DNA-Sequenzen. In den 24 Klonen der DNA aus fetalem Gehirn ließen sich 16 Klone auf vollständig unmethylierte DNA-Sequenzen zurückführen, nur zwei zeigten jeweils ein methyliertes CpG. Sechs Klone stammen von DNA-Sequenzen ab, die etwa zur Hälfte methyliert sind. Wie schon zuvor bei dem PWS-Patienten beobachtet wurde, waren auch hier die CpGs 10-13 vollständig unmethyliert.



**Abbildung 3.9: Methylierungsanalyse des CpG-Islands CpG40 in DNA zweier Normalpersonen, einem PWS- und einem AS-Patienten, aus Spermien und aus fetalem Gehirn**

Die CpGs sind als Kreise dargestellt. Weiße Kreise: unmethylierte CpGs; schwarze Kreise: methylierte CpGs. Fehlende Kreise beruhen auf nicht exakt auswertbaren Sequenzabschnitten.

### 3.1.5.2 Methylierungsstatus des CpG30

Das 391 bp große CpG-Island CpG30 ist 18 kb telomerisch von *UIB\** und 8 kb centromerisch von *UIA* lokalisiert (Abbildung 3.7). Sechs der 30 CpGs wurden, wie in 3.1.5 beschrieben, durch PCR-Amplifikation eines 224 bp großen Bereichs mit anschließender Sequenzierung von bisulfitbehandelter DNA untersucht (Abbildung 3.10). Die verwendeten Primer sind im Anhang auf Seite 104 aufgeführt. Von den 22 CpGs innerhalb des amplifizierten Bereiches werden nur sechs gezeigt, da die übrigen CpGs in allen analysierten DNA-Proben meistens unmethyliert waren.

```

AAATAGCAGGGGGAAGGGCAACACCGAATCCTCCAGTCCCGCGCAGGCGCAA
ATAGGATCTGCCCCCGCCCCCGCCCCCGCCCCCGCCGCGCCCCCGCCCCACCG
CCGCCCCCGCCCCCAGCTCCGTCCTGTGACCTTCCCACAGCGCACCA1CGAGCTG
GTTGGC2CGCAC3CGGACAGTGG4CGCATTTGCTG5CGGGC6CGCCCTGTGAGGTTGGA
GGACCTA

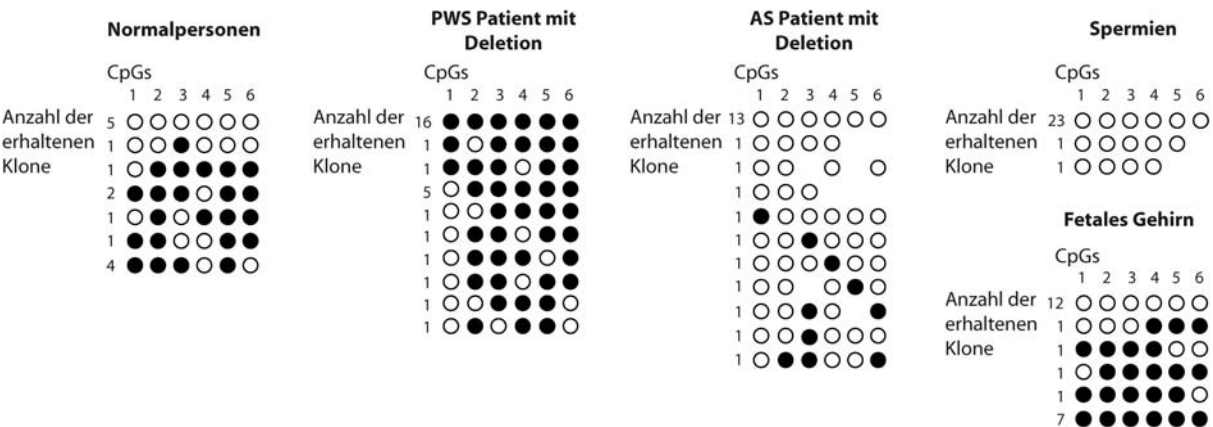
```

**Abbildung 3.10: Sequenzausschnitt des CpG-Islands CpG30, der in der Methylierungsanalyse untersucht wurde**

Die CpGs sind grau unterlegt, die analysierten CpGs sind zusätzlich numeriert. Die Lokalisation der Primersequenzen ist unterstrichen.

Die 15 Klone der beiden Normalpersonen stammen zur Hälfte von vollständig unmethylierten DNA-Sequenzen ab (Abbildung 3.11). Die andere Hälfte lässt sich auf überwiegend methylierte DNA-Sequenzen zurückführen. Bei den 29 Klonen des PWS-Patienten sind fast alle CpGs methyliert. Sechzehn Klone repräsentieren vollständig, 13 Klone überwiegend methylierte DNA-Sequenzen. Die 23 sequenzierten Klone des AS-Patienten ließen sich auf fast vollständig unmethylierte DNA-Sequenzen zurückführen. Es gab nur sieben Klone, die vereinzelt ein methyliertes CpG aufzeigten. Auch hier deuteten die Ergebnisse wie schon beim CpG40 auf eine tendenzielle Methylierung des maternalen Allels hin, während das paternale Allel fast vollständig unmethyliert ist.

Bei der Analyse der Spermien-DNA wurden nur Klone von vollständig unmethylierten DNA-Sequenzen erhalten. Zwölf der Klone der DNA aus fetalem Gehirn ließen sich auf vollständig unmethylierte, 11 der Klone auf vorwiegend methylierte DNA-Sequenzen zurückführen.

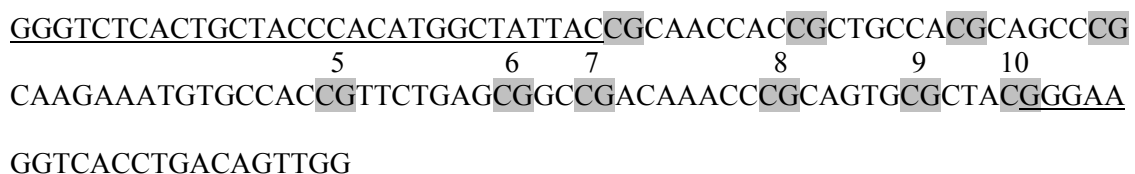


**Abbildung 3.11: Methylierungsanalyse des CpG-Islands CpG30 in DNA zweier Normalpersonen, einem PWS- und einem AS-Patienten, aus Spermien und aus fetalem Gehirn**

Die CpGs sind als Kreise dargestellt. Weiße Kreise: unmethylierte CpGs; schwarze Kreise: methylierte CpGs. Fehlende Kreise beruhen auf nicht exakt auswertbaren Sequenzabschnitten.

### 3.1.5.3 Methylierungsstatus des CpG37

Das 351 bp große CpG-Island CpG37 ist 18 kb telomerisch von *UIA* und 8 kb centromerisch von *U2* entfernt lokalisiert (Abbildung 3.7). Es besteht aus 37 CpGs, von denen 10 innerhalb eines 128 bp großen Bereiches analysiert worden sind. Dazu wurden PCR-Produkte wie in 3.1.5 beschrieben analysiert, die für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer sind im Anhang auf Seite 104 aufgeführt.

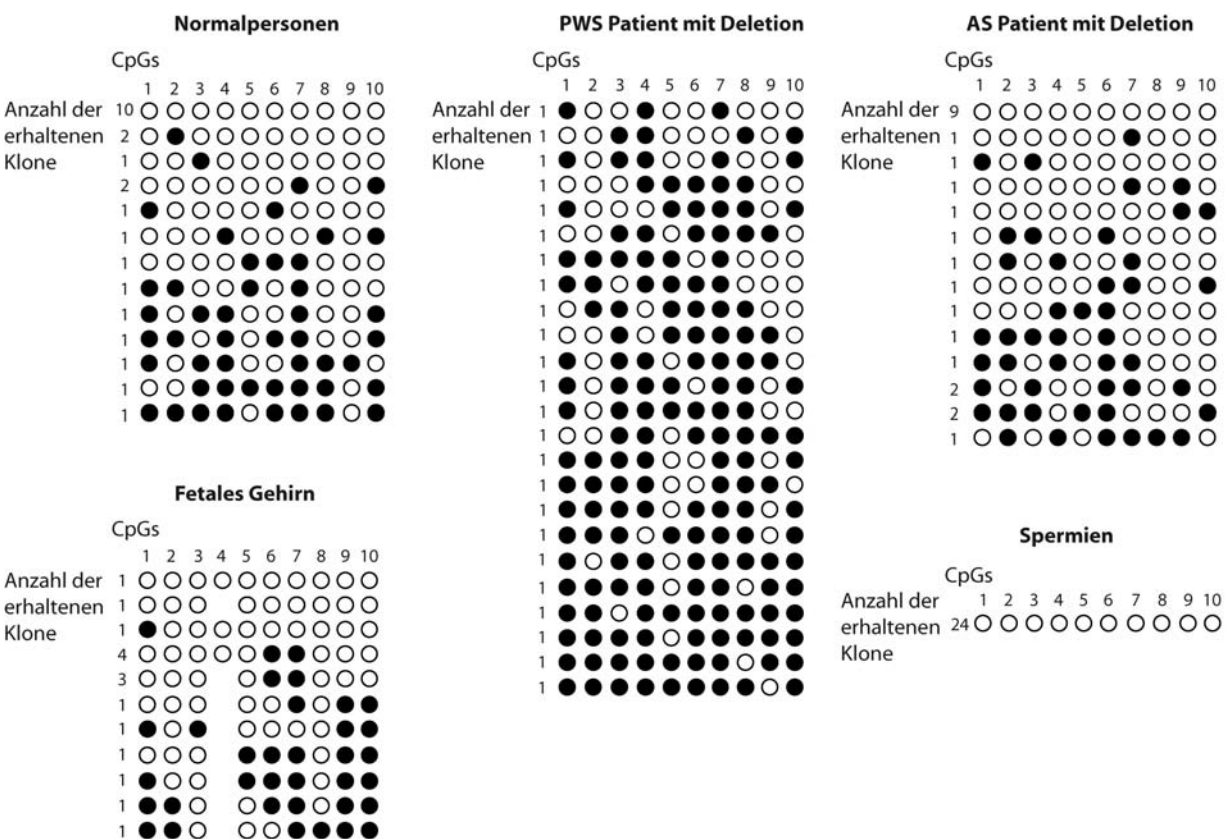


**Abbildung 3.12: Sequenzausschnitt des CpG-Islands CpG37, der in der Methylierungsanalyse untersucht wurde**

Die analysierten CpGs sind grau unterlegt und nummeriert. Die Lokalisation der Primersequenzen ist unterstrichen.

Die 24 analysierten Klone der Normalpersonen stammen etwa zur Hälfte von komplett unmethylierten DNA-Sequenzen ab, neun Klone enthalten vereinzelt methylierte CpGs und

Die Klone aus der Spermien-DNA stammen wie auch bei CpG40 und CpG30 von komplett unmethylierten DNA-Sequenzen ab. Die Klone der DNA aus fetalem Gehirn ließen sich zum überwiegenden Teil auf unmethylierte DNA-Sequenzen zurückführen. Vier Klone stammen von tendenziell methylierten Sequenzen ab.



**Abbildung 3.13: Methylierungsanalyse des CpG-Islands CpG37 in DNA zweier Normalpersonen, einem PWS- und einem AS-Patienten, aus Spermien und aus fetalem Gehirn**

Die CpGs sind als Kreise dargestellt. Weiße Kreise: unmethylierte CpGs; schwarze Kreise: methylierte CpGs. Fehlende Kreise beruhen auf nicht exakt auswertbaren Sequenzabschnitten.



### 3.2 Weiterführende Analysen des Gens *C15orf2* der PWS/AS-Genregion

Im Jahr 2000 wurde von unserer Arbeitsgruppe ein neues intronloses Gen innerhalb der PWS/AS-Genregion identifiziert (Färber *et al.*, 2000). *C15orf2* ist in einer dem genomischen Imprinting unterliegenden Region lokalisiert und es konnte gezeigt werden, dass *C15orf2* in fetalem Gehirn monoallelisch exprimiert wird (Buiting *et al.*, 2007). Dies gab den ersten Hinweis, dass auch *C15orf2* dem genomischen Imprinting unterliegt. Im Verlauf dieser Arbeit sollten nun weiterführende Analysen des Gens erfolgen sowie das bislang nicht nachgewiesene Protein identifiziert und lokalisiert werden.

#### 3.2.1 Methylierungsanalyse von *C15orf2*

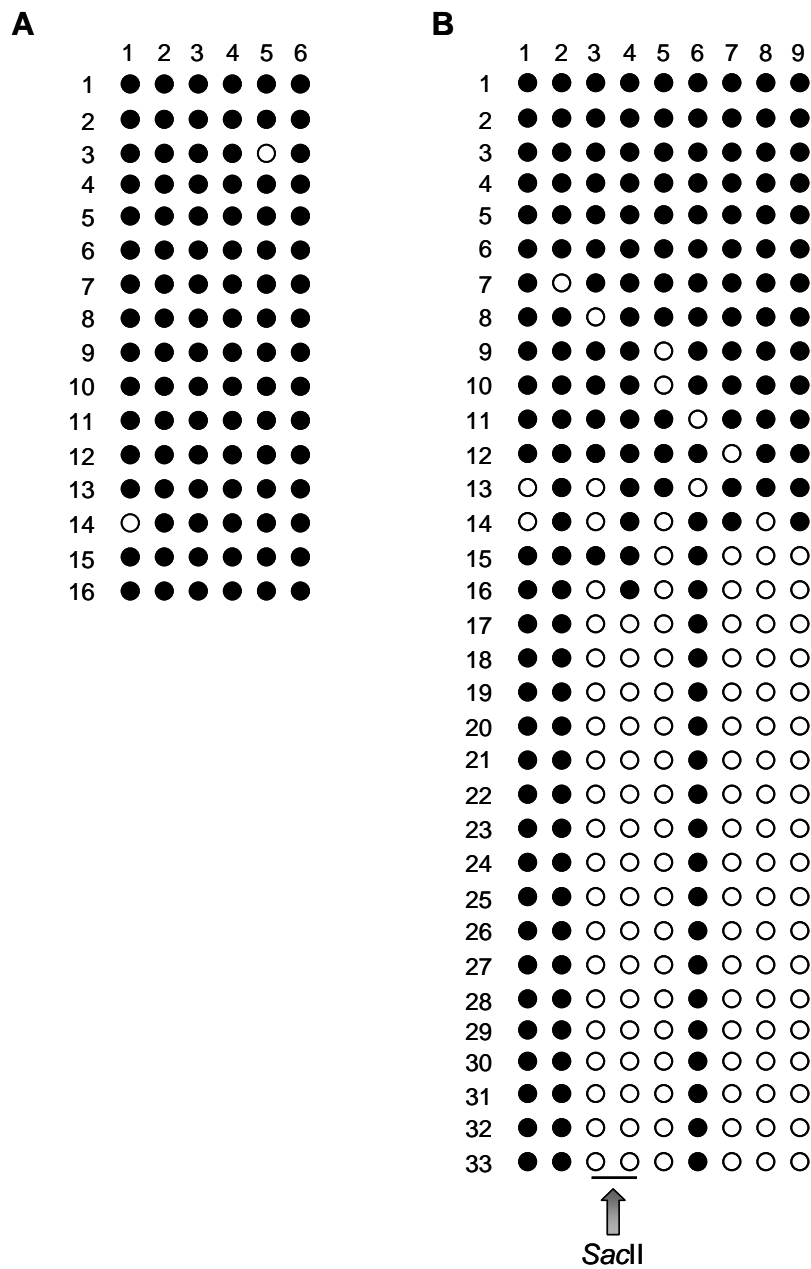
Im Jahre 2000 wurden erste Methylierungsanalysen (Färber *et al.*, 2000) des *C15orf2* CpG-Islands durchgeführt, indem der Methylierungsstatus mithilfe methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen und Southern-Blot Analysen bestimmt wurde. Dabei wurde eine *NotI*- sowie eine *SacII*-Schnittstelle innerhalb des CpG-Islands analysiert.

Damals konnte gezeigt werden, dass das CpG-Island von *C15orf2* im Bereich der *SacII*-Schnittstelle in Blutzellen, fetalem Ovar, Testis, Gehirn- und Amniongewebe komplett methyliert und in Spermien komplett unmethyliert vorliegt. Im Bereich der *NotI*-Schnittstelle liegt das CpG-Island in Blutzellen, Gehirn- und Amnionzellen methyliert vor, in Spermien komplett unmethyliert. Fetales Ovar und Testis waren hauptsächlich methyliert, jedoch konnte hier in einem kleinen Teil der Zellen auch eine unmethylierte Schnittstelle nachgewiesen werden.

Aufgrund der mittlerweile nachgewiesenen monoallelischen Expression von *C15orf2* in fetalem Gehirn (Buiting *et al.*, 2007) sollte nun eine genauere Analyse des Methylierungsstatus des CpG-Island in diesem Gewebe durchgeführt werden, um herauszufinden, ob die monoallelische Expression mit einer differentiellen Methylierung der CpGs assoziiert ist. Dazu wurden zwei Bereiche des CpG-Islands analysiert, zum einen ein 118 bp großer Bereich im 5' UTR des Gens, welcher sechs CpG-Dinukleotide beinhaltet, sowie ein 285 bp großer Bereich stromabwärts des Start-Codons, in dem neun CpG-Dinukleotide analysiert wurden und der die schon zuvor untersuchte *SacII*-Schnittstelle beinhaltet (Abbildung 3.14). Zunächst wurde genomische DNA aus fetalem Gehirn mit Bisulfit behandelt. Anschließend wurden die beiden Fragmente durch eine PCR mit Primern

**Abbildung 3.14: Sequenzausschnitte des *CI5orf2* CpG-Islands, die in der Methylierungsanalyse untersucht wurden**

Für den Bereich im 5'UTR des Gens wurden 16 Klone analysiert, die sich alle auf komplett methylierte DNA-Sequenzen zurückführen ließen (Abbildung 3.15). Für den Bereich stromabwärts des Start-Codons wurden 33 Klone analysiert. 15 Klone stammen von vorwiegend methylierten DNA-Sequenzen ab, während 17 Klone eine Methylierung der CpG 1, 2 und 6 der DNA-Sequenz aufzeigten, während die restlichen sechs der neun CpG-Dinukleotide unmethyliert waren. Die *SacII*-Schnittstelle war in den vorwiegend methylierten DNA-Sequenzen fast immer methyliert, während sie in den tendenziell unmethylierten DNA-Sequenzen unmethyliert vorlag. Dies deutet auf eine differentielle Methylierung der *SacII*-Schnittstelle hin.



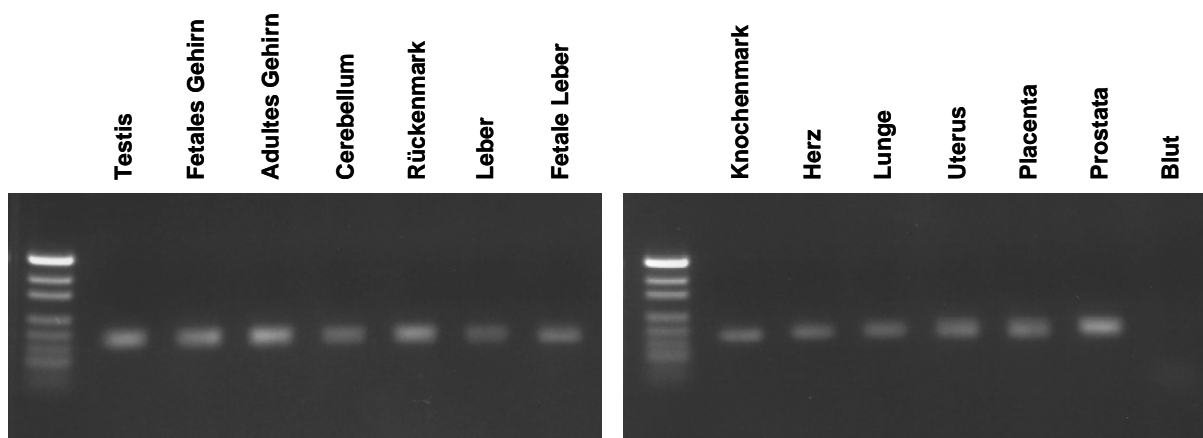
**Abbildung 3.15: Methylierungsanalyse des CpG-Islands von *C15orf2* in fetalem Gehirn**

Methylierte CpG-Dinukleotide sind durch schwarze Kreise, unmethylierte durch weiße Kreise gekennzeichnet. Die Lage der *SacII* Schnittstelle ist durch einen Pfeil dargestellt A) Die Methylierung von sechs CpGs im 5'UTR in 16 Klonen. B) Die Methylierung von neun CpGs downstream des Start-Codons in 33 Klonen

### 3.2.2 Expressionsanalysen des *C15orf2*-Gens

#### 3.2.2.1 Expressionsanalyse des *C15orf2*-Gens in verschiedenen Geweben

Bislang war eine Expression des *C15orf2*-Gens nur in Testis und fetalem Gehirn bekannt (Färber *et al.*, 2000, Buiting *et al.*, 2007). Durch den Nachweis einer schwachen Expression des benachbarten Gens *PWRN1* in weiteren Geweben wie z.B. Herz, Lunge und Rückenmark stellte sich die Frage, ob *C15orf2* ubiquitär exprimiert ist, diese Expression aber zu schwach ist, um sie über eine Northern-Blot-Analyse nachzuweisen. Um dies zu untersuchen, wurde die Expression eines 169 bp großen Bereichs in der codierenden Region des Gens sowie eines 142 bp großen Bereichs im 3'UTR des Gens in unterschiedlichen Geweben mittels RT-PCR untersucht (verwendete Primer sind im Anhang auf Seite 105 angegeben). Es konnte eine Expression der codierenden Region (Daten nicht gezeigt) und des 3'UTRs (Abbildung 3.16) in 13 der 14 getesteten Geweben nachgewiesen werden. Nur in Blutzellen konnte keine Expression nachgewiesen werden. Da *C15orf2* ein intronloses Gen ist, wurde als Kontrolle, um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, eine RT-PCR mit intronüberspannenden Primern für Exon 4 und 5 des  $\beta$ -Actin-Gens durchgeführt. Im Falle einer Kontamination mit genomischer DNA werden zwei PCR-Produkte erhalten, ein kleineres, was aus der Amplifikation der cDNA hervorgeht, sowie ein größeres, was aus der Amplifikation der genomischen DNA hervorgeht und neben den Exonsequenzen auch Intronsequenzen besitzt. Bei der Amplifikation von  $\beta$ -Actin konnte kein ungespleißtes PCR-Produkt erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA konnte somit ausgeschlossen werden.



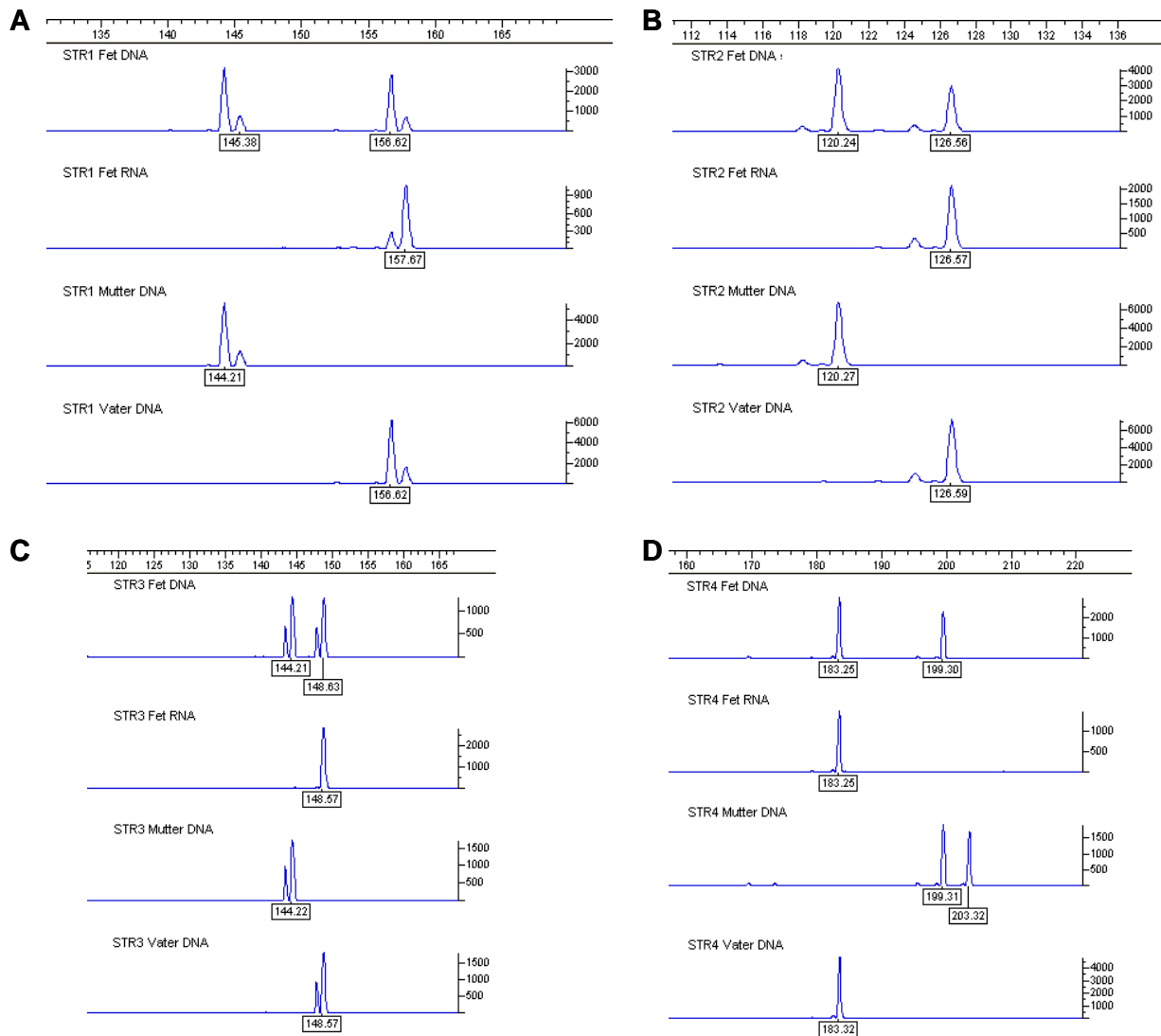
**Abbildung 3.16:** RT-PCR Analyse der Expression eines 142 bp großen Bereichs im 3'UTR von *C15orf2* in verschiedenen Geweben

In der jeweils ersten Spur ist der Marker (pUC19) sichtbar.

### 3.2.2.2 *C15orf2* wird in fetalem Gehirn vom paternalen Chromosom exprimiert

Die benachbarten Gene von *C15orf2*, *PWRN1* und *SNURF-SNRPN*, unterliegen dem genomischen Imprinting und werden vom paternalen Allel exprimiert. Somit liegt die Vermutung nahe, dass dies auch für *C15orf2* zutreffen könnte.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass *C15orf2* in fetalem Gehirn monoallelisch exprimiert wird (Buiting *et al.*, 2000) und dass eine differentielle Methylierung (siehe 3.2.1) in Bereichen des CpG-Islands des Gens in fetalem Gehirn vorliegt. Bislang konnte jedoch aus Mangel an geeigneten fetalen und entsprechenden elterlichen DNA und RNA-Proben noch nicht geklärt werden, ob diese Expression auf das paternale oder maternale Allel beschränkt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun geeignetes Probenmaterial aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Essen erhalten und analysiert werden. DNA aus fetalem Gehirn sowie aus dem Blut der Eltern wurde hinsichtlich vier Nukleotidwiederholungssequenzen (*short tandem repeats*, STRs) im 3'UTR des Gens, analysiert. Hierbei handelt es sich um drei Tetranukleotidwiederholungssequenzen an den Positionen 4099 (GTTT<sub>n</sub>), 5508 (GATA<sub>n</sub>) und 5898 (GATA<sub>n</sub>) sowie eine Dinukleotidwiederholungssequenz (GT<sub>n</sub>) an der Position 4726 der *C15orf2*-Referenzsequenz AF179681. Dazu wurden die entsprechenden Bereiche mittels einer PCR amplifiziert (Primersequenzen siehe Anhang Seite 104) und die Fragmentlängen der erhaltenen Produkte mittels Genescan-Software analysiert. Die Analyse der vier Nukleotidwiederholungssequenzen zeigte in DNA aus fetalem Gehirn eine Heterozygotie für alle vier Polymorphismen (Abbildung 3.17). In der entsprechenden RNA konnte nur ein Allel nachgewiesen werden. Dieses Allel konnte für alle vier Polymorphismen nach Analyse der elterlichen DNA dem paternalen Allel zugeordnet werden. Somit wird *C15orf2* wie auch die umliegenden Gene *PWRN1* und *SNURF-SNRPN* vom paternalen Allel aus exprimiert.



**Abbildung 3.17: Allelische Expressionsanalyse von *C15orf2* in humanem fetalen Gehirn**

Genotypisierung von RNA aus einem fetalen Gehirn und von der entsprechenden elterlichen DNA zeigt die alleinige Expression des paternalen Allels in allen vier getesteten Polymorphismen. In der fetalen Gehirn DNA konnten beide parental Allele detektiert werden. In der Abbildung werden die exprimierten Allel für die Polymorphismen nt4099 (A), nt4726 (B), nt5508 (C) and nt5898 (D) dargestellt.

### 3.2.2.3 Nachweis des endogenen *C15orf2*-Proteins

Um das *C15orf2*-Protein nachweisen zu können, wurde ein spezifischer Antikörper benötigt. Da kein Antikörper gegen *C15orf2* kommerziell erhältlich ist, wurde bei der Firma Eurogentec die Generierung von Antikörpern gegen *C15orf2* durch Immunisierung von Kaninchen gegen Oligopeptide, die potentiell gute antigene Bereiche des Proteins darstellen,

in Auftrag gegeben. Nach einer bioinformatischen Analyse der Proteinsequenz von C15orf2 wurden von Eurogentec sechs mögliche Oligopeptide, gegen die ein Antikörper generiert werden konnte, vorgeschlagen:

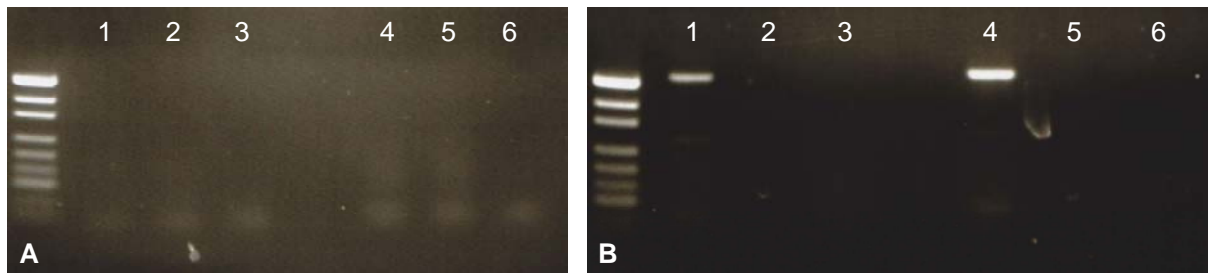
1. KFRPGCRRRPLPGPGR (aa 7-22 von C15orf2)
2. QEGPRRVKKDEDPVQ (aa 154-168 von C15orf2)
3. EGDLTLEKSPEYKR (aa 363-377 von C15orf2)
4. TPQPKFEAPDGQPQK (aa 644-658 von C15orf2)
5. AQADRRPTTTSSHPL (aa 877-891 von C15orf2)
6. TWTERKFYTSSTHY (aa 1127-1141 von C15orf2)

Nach eingehender Prüfung auf den Gehalt an bekannten SNPs in den der Aminosäuresequenzen entsprechenden DNA-Sequenzen oder Sequenzhomologien zu anderen Proteinen wurden zwei Aminosäuresequenzen (1. und 4.) als Epitope ausgewählt, gegen die die Immunisierung durchgeführt worden ist.

Erhalten wurden die Seren von zwei Kaninchen, die jeweils Antikörper gegen beide Epitope beinhalten, sowie affinitätsaufgereinigte Antikörper gegen beide Epitope. Um die Spezifität der Seren und der aufgereinigten Antikörper zu testen, wurden Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten aus nativen und mit dem Expressionsplasmid pCMV6-Entry\_C15orf2 (OriGene) transfizierten HeLa und HEK-293-Zellen durchgeführt. In diesem Plasmid wird der ORF von *C15orf2* an einen FLAG-Tag und einen Myc-Tag gekoppelt und das Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Das so erstellte Protein kann somit nicht nur mit einem C15orf2-spezifischen Antikörper, sondern auch mit etablierten Antikörpern gegen beide Fusions-Tags nachgewiesen werden.

Zunächst wurde jedoch durch eine RT-PCR an RNA dieser Zellen überprüft, ob in nativen Zellen eine Expression von *C15orf2* vorliegt. Dabei wurden dieselben Primer für eine 142 bp große Region im 3'UTR verwendet, wie schon zuvor bei dem Nachweis der Expression von *C15orf2* in verschiedenen Geweben (siehe 3.2.2.1). Es konnte kein RT-PCR-Produkt erhalten werden, was auf eine fehlende Expression von *C15orf2* in beiden Zelllinien hinweist (Abbildung 3.18A). Auch hier wurde als Kontrolle, um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wie schon zuvor bei der Expressionsanalyse von C15orf2 in verschiedenen Geweben (3.2.2.1) eine RT-PCR mit intronüberspannenden Primern für Exon 4 und 5 des  $\beta$ -Actin-Gens durchgeführt. Bei der Amplifikation von  $\beta$ -Actin konnte kein

ungespleißtes PCR-Produkt erhalten werden (Abbildung 3.18B). Eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA konnte somit ausgeschlossen werden.



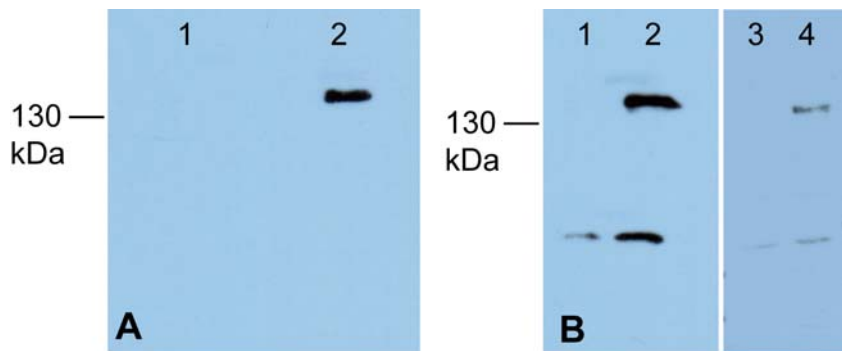
**Abbildung 3.18: RT-PCR Analyse von *C15orf2* in HEK-293 und HeLa-Zellen**

In der jeweils ersten Spur ist der Marker (pUC19) sichtbar. A) RT-PCR Produkte der Expression eines 142 bp großen Bereichs im 3'UTR von *C15orf2*. RT-PCR (Spur 1), Kontrolle ohne RNA (Spur 2), Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (Spur 3) an RNA aus HEK-293-Zellen. RT-PCR (Spur 4), Kontrolle ohne RNA (Spur 5), Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (Spur 6) an RNA aus HeLa-Zellen. B) RT-PCR Produkte der Expression von  $\beta$ -Actin. RT-PCR (Spur 1), Kontrolle ohne RNA (Spur 2), Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (Spur 3) an RNA aus HEK-293-Zellen. RT-PCR (Spur 4), Kontrolle ohne RNA (Spur 5), Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (Spur 6) an RNA aus HeLa-Zellen.

Bei der Durchführung der Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten nativer und transfizierter HeLa- und HEK-293-Zellen konnten unter Verwendung der Antiseren keine Banden im erwarteten Bereich detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein ähnliches Resultat konnte mit der Anwendung des aufgereinigten Antikörpers gegen das Epitop 1 erzielt werden. Hingegen konnte mit dem aufgereinigten Antikörper gegen das Epitop 4 eine spezifische Bande in der erwarteten Höhe von 130 kDa detektiert werden, die auch unter der Verwendung eines Antikörpers spezifisch gegen den FLAG-Tag (Stratagene) detektiert werden konnte (Abbildung 3.19). In dem Proteinextrakt aus untransfizierten Zellen ließ sich mit dem *C15orf2*-spezifischen Antikörper keine Bande bei 130 kDa nachweisen. Jedoch kann im Proteinextrakt aus nativen wie auch aus transfizierten Zellen eine Bande bei 60 kDa detektiert werden, deren Identität nicht bekannt ist.

In den nachfolgenden Versuchen wurde somit nur der Antikörper gegen das Epitop 4 verwendet und Proteinextrakte aus transfizierten HeLa- und HEK-293-Zellen als Positivkontrolle, aus untransfizierten HeLa- und HEK-293-Zellen als Negativkontrolle verwendet.



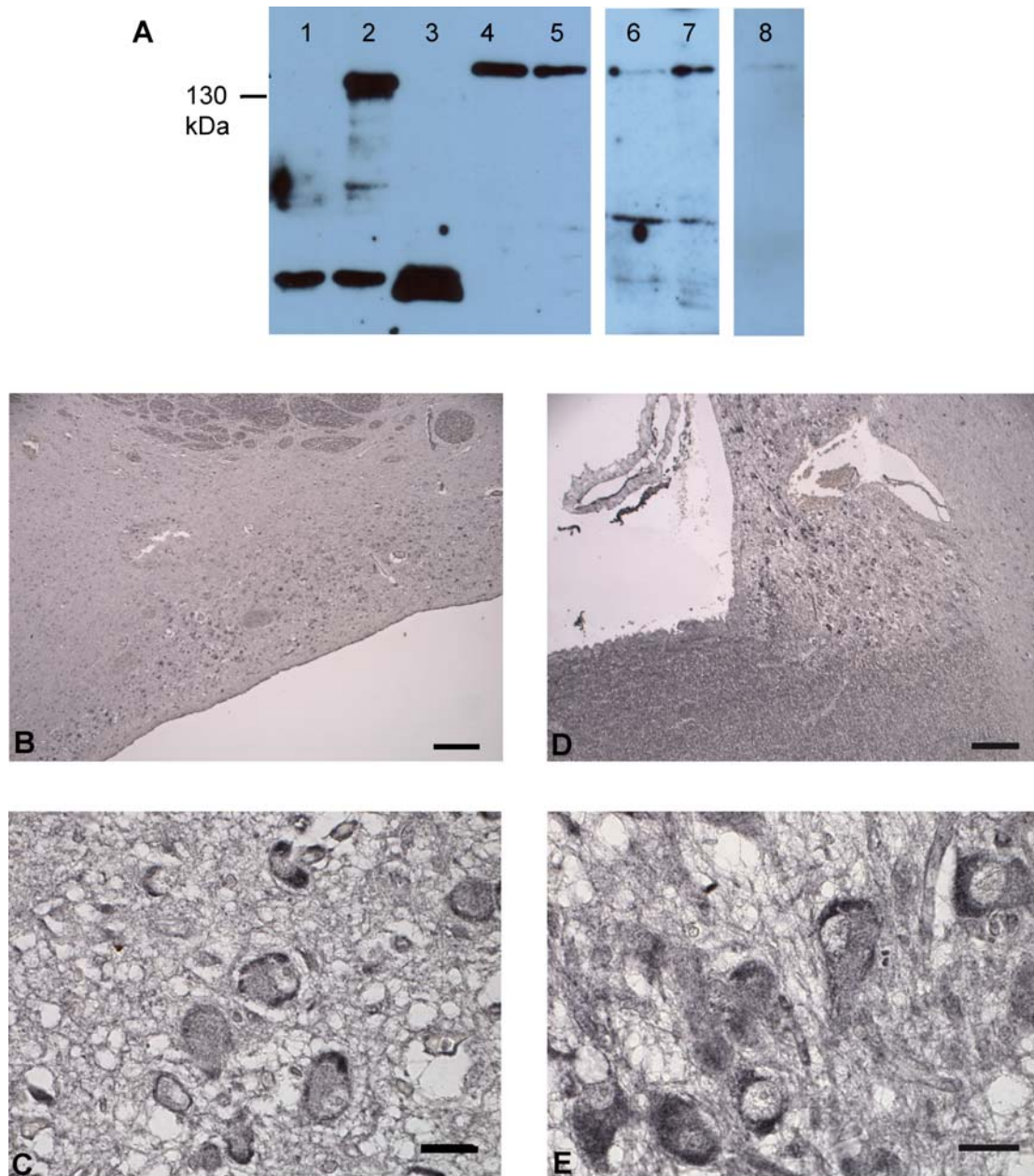


**Abbildung 3.19: Western-Blot-Analysen zur Kontrolle der Spezifität des C15orf2-spezifischen Antikörpers**

A) Western-Blot-Analyse mit Proteinextrakten aus HeLa-Zellen (Spur 1) und transfizierten HeLa-Zellen, die *C15orf2* transient überexprimieren (Spur 2), bei dem C15orf2 mit einem anti-FLAG-Antikörper detektiert wurde. B) zeigt Western-Blot-Analysen mit untransfizierten (Spur 1) und transfizierten (Spur 2) HeLa-Zellen sowie untransfizierten (Spur 3) und transfizierten (Spur 4) HEK-293-Zellen, bei denen das Protein mit dem C15orf2-spezifischen Antikörper detektiert wurde.

Um das endogene C15orf2-Protein nachzuweisen, wurden Western-Blot-Analysen mit Proteinextrakten aus verschiedenen Hirnregionen und Testis durchgeführt. Entsprechende Gewebeproben wurden aus dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Das endogene C15orf2 konnte im Cortex, Hypothalamus, Putamen und Nucleus caudatus nachgewiesen werden, jedoch nicht im Testis (Abbildung 3.20A). Auch im Kleinhirn, Thalamus, Globus pallidus, Pons, Substantia nigra, Epiphyse und im Ammonshorn konnte kein C15orf2-Protein nachgewiesen werden. Die Bande des endogenen C15orf2-Proteins migriert etwas höher als die des durch Transfektion von HeLa-Zellen überexprimierten Proteins.

Die Lokalisation des Proteins im Hypothalamus wurde zusätzlich immunhistologisch in humanen Gehirnschnitten nachgewiesen (Abbildung 3.20B-E). Diese Färbungen wurden von Unga Unmehopa und Dick Swaab vom Institut für Neurowissenschaften, Academy of Arts and Science, Amsterdam, mit dem schon zuvor in Western-Blot-Analysen verwendeten C15orf2 spezifischen Antikörper durchgeführt. C15orf2 konnte in Neuronen des Paraventriculären Nucleus und des Supraoptischen Nucleus nachgewiesen werden. Es konnte hier überwiegend im Cytoplasma, wahrscheinlich in der Region der Nissl-Substanz, detektiert werden.

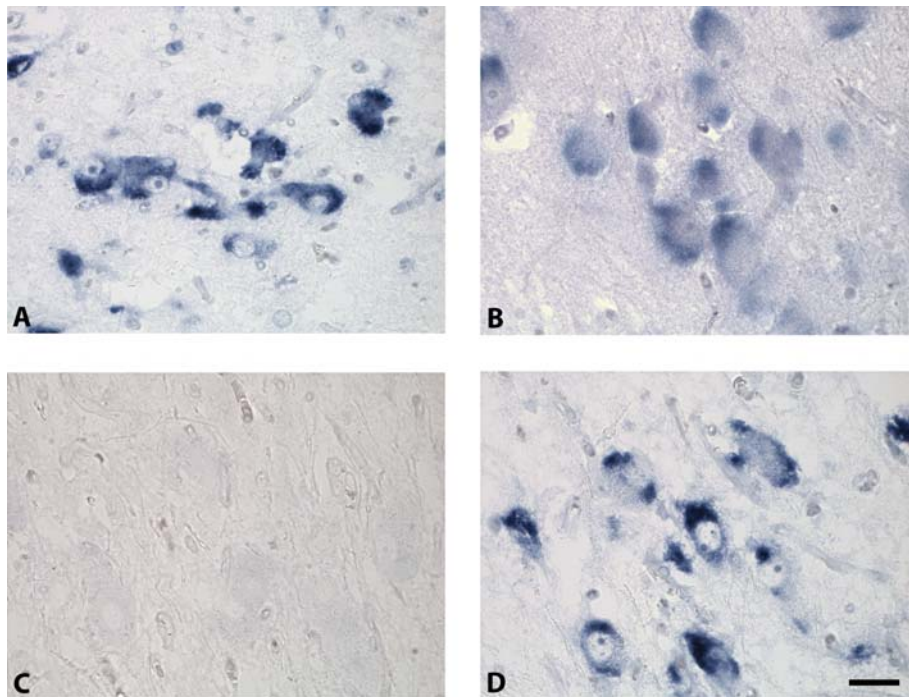


**Abbildung 3.20: Detektion des endogenen C15orf2-Proteins**

A) Western-Blot-Analysen mit Proteinextrakten aus HeLa-Zellen (Spur 1, Negativkontrolle) und HeLa Zellen, die *C15orf2* transient überexprimieren (Spur 2, Positivkontrolle), sowie Proteinextrakten aus Testis (Spur 3), aus Cortex von zwei verschiedenen Individuen (Spur 4 und 5), Putamen (Spur 6), Nucleus caudatus (Spur 7) und Hypothalamus (Spur 8). C15orf2 wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. B)-E) Immunhistologische Färbungen von humanen Gehirnschnitten des Hypothalamus. C15orf2 konnte im Paraventrikulären Nucleus (B) 5x, C) 63x vergrößert) und im Supraoptischen Nucleus (D) 5x, E) 63x vergrößert) mit einem C15orf2-spezifischen Antikörper detektiert werden. Längsbalken 5x Vergrößerung: 250µm, 63x Vergrößerung: 25µm. Abbildungen B)-E) zur Verfügung gestellt von U. Unmehopa und D. Swaab.

Des Weiteren sind 499 bp große Sonden hergestellt worden, um *C15orf2*-mRNA über eine *in situ*-Hybridisierung in humanen Gehirnschnitten zu detektieren. Dazu wurde ein PCR-Produkt der Basenpaare 3262-3760 der *C15orf2*-Nukleotidsequenz (AF179681) in das pBlueskript II KS-Plasmid zwischen die Promotoren T7 und T3 inseriert. Durch Verwendung des T3-Promotors kann man mit diesem Konstrukt eine Sonde in *Antisense*-Orientierung, durch Verwendung des T7-Promotors in *Sense*-Orientierung synthetisieren. Die verwendeten Primer sind im Anhang auf Seite 105 aufgeführt. Dieses Plasmid wurde U. Unmehopa und D. Swaab für die Sondensynthese und die Durchführung der *in situ*-Hybridisierungen an humanen Gehirnschnitten des Hypothalamus zur Verfügung gestellt.

Ein spezifisches Signal der *Antisense*-Sonde konnte in Neuronen des Paraventriculären Nucleus, im Supraoptischen Nucleus und im Meynert-Basalkern nachgewiesen werden (Abbildung 3.21A, B, D). Die *C15orf2*-mRNA konnte im Bereich der Nissl-Substanz im Cytosol der Neuronen lokalisiert werden. Mit den *Sense*-Sonden konnte kein Signal erhalten werden (Abbildung 3.21C), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die *C15orf2*-mRNA durch die *Antisense*-Sonden spezifisch detektiert werden konnte.



**Abbildung 3.21: *In situ*-Hybridisierung von humanen Gehirnschnitten des Hypothalamus**

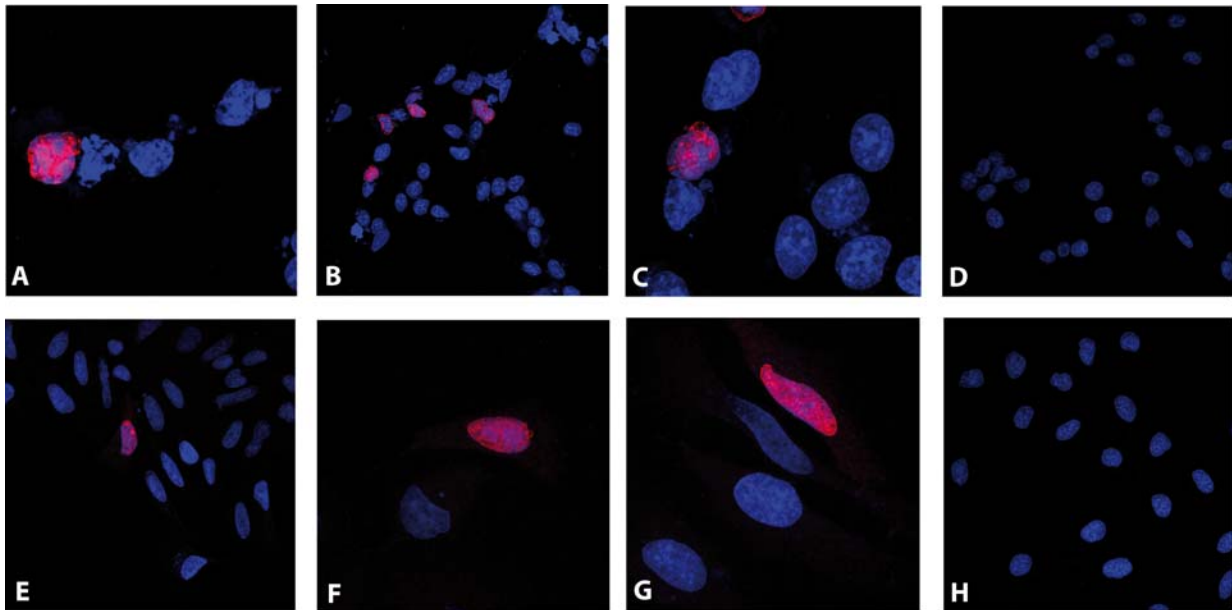
*C15orf2*-mRNA konnte im Paraventriculären Nucleus (A), im Meynert-Basalkern (B) und im Supraoptischen Nucleus (D) nachgewiesen werden. Kein Signal konnte mit der *Sense*-Sonde erhalten werden ((C) Supraoptischer Nucleus). Vergrößerung jeweils 63x, Längenbalken: 25µm. Abbildungen zur Verfügung gestellt von U. Unmehopa und D. Swaab.

#### 3.2.2.4 Intrazelluläre Lokalisation von C15orf2

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation des Proteins sollte eine immunhistologische Färbung an Zellen, die C15orf2 transient überexprimieren, durchgeführt werden. Als Zellkulturmodell wurden HeLa- und HEK-293-Zellen gewählt, bei denen keine Expression von *C15orf2* vorliegt (siehe 3.2.2.3).

Die Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCMV6-Entry\_C15orf2 (OriGene) transfiziert, wodurch C15orf2 gekoppelt an einen FLAG-Tag überexprimiert wird. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen immunhistologisch gefärbt. Dabei wurden der schon zuvor beschriebene (siehe 3.2.2.3) C15orf2-spezifische Antikörper (Eurogentec) und ein Antikörper gegen den FLAG-Tag (Stratagene) verwendet. Beide Primärantikörper wurden mit den jeweiligen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert und die Zellkerne mit 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI blue) gefärbt. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen ebenfalls gefärbt. Eine unspezifische Kopplung der Antikörper würde durch eine Färbung der untransfizierten Zellen sichtbar werden.

Im Gegensatz zu den immunhistologischen Färbungen von Gewebeschnitten des Hypothalamus (siehe 3.2.2.3) konnte man unter Verwendung beider Antikörper deutlich eine nukleäre Lokalisation des Proteins erkennen (Abbildung 3.22). Eine leichte Färbung ließ sich auch im Cytoplasma ausmachen. In den untransfizierten Zellen ließ sich keine Färbung detektieren. Damit ist eine unspezifische Kopplung der jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper ausgeschlossen.



**Abbildung 3.22: Intrazelluläre Lokalisation von C15orf2**

C15orf2 (rot) wurde mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem anti-C15orf2-Antikörper durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie detektiert. Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt (blau). C15orf2 detektiert durch den anti-FLAG-Antikörper in transfizierten HEK-293 (A) und HeLa (E) Zellen; C15orf2 detektiert durch den anti-C15orf2-Antikörper in transfizierten HEK-293 (B,C) und HeLa (F,G) Zellen; immunhistologische Färbung von untransfizierten HEK-293 (D) und HeLa-Zellen (H) mit dem anti-C15orf2-Antikörper.

Diese nachgewiesene nukleäre Lokalisation stimmt mit den Ergebnissen überein, die durch eine bioinformatische Analyse mit PSORTII, einer Software für die Vorhersage der subzellulären Lokalisation von eukaryotischen Proteinen (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) gewonnen wurde. Diese sagt eine wahrscheinlich nukleäre Lokalisation des Proteins durch die Identifizierung von sechs potentiellen nukleären Lokalisationssignalen (NLS) voraus (Tabelle 3.1). Es werden hierbei zwei Typen von NLS unterschieden, pat4 bezeichnet ein NLS, welches aus vier basischen Aminosäuren (Lysin (K) oder Arginin (R)) oder aus drei basischen Aminosäuren und Histidin (H) oder Prolin (P) besteht, pat7 bezeichnet ein NLS welches mit P beginnt, was nach höchstens drei Aminosäuren gefolgt wird von einem basischen Segment von mindestens drei K oder Rs innerhalb von vier Aminosäuren.

**Tabelle 3.1: Sequenzen der potentiellen nukleären Lokalisationssignale (NLS), welche von PSORTII für C15orf2 vorhergesagt werden**

NLS-Typ	NLS-Aminosäuresequenz	NLS-Position im C15orf2 Protein
pat4	RRRP	13-16
pat4	RRRP	56-59
pat7	PGCRRRP	10-16
pat7	PAVKARK	133-139
pat7	PRRVKKD	157-163
pat7	PCKRKMS	325-331

### 3.2.3 Sequenzvarianten und Haplotypen von *C15orf2*

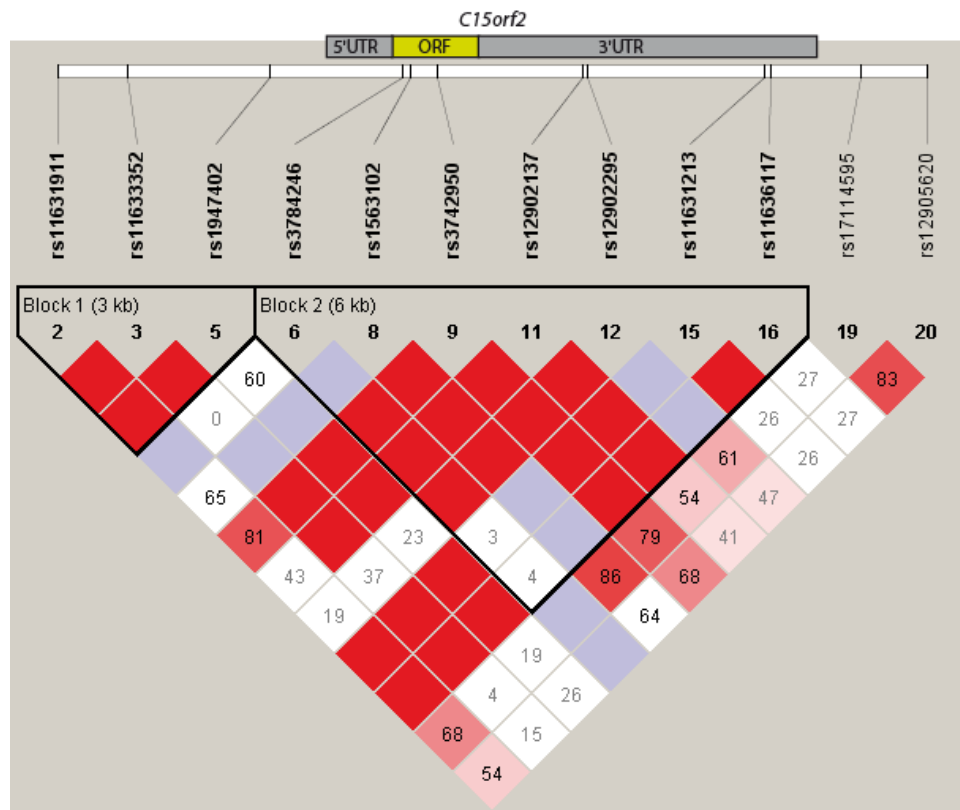
Ein weiterer interessanter Aspekt von *C15orf2* ist seine potentielle evolutionsbiologische Bedeutung. So wurde in zwei Arbeiten eine positive Selektion für dieses Gen berichtet (Nielsen *et al.*, 2005; Kosiol *et al.*, 2008). Mithilfe einer populationsgenetischen Methode, der Analyse komplexer Haplotypen, sollten in dieser Arbeit weitere Hinweise auf eine positive Selektion des Gens gefunden werden.

#### 3.2.3.1 Analyse der Haplotypstruktur von *C15orf2*

Um die Haplotypstruktur von *C15orf2* sichtbar zu machen, wurde die Software Haploview (Version 4.0) verwendet. Diese analysiert Genotypisierungsdaten von SNPs verschiedener Populationen aus dem internationalen HapMap Projekt zur Erstellung einer Haplotypkarte des humanen Genoms bezüglich Sequenzvariationen, um Haplotypblöcke mit Kopplungsungleichgewichten darzustellen.

Für *C15orf2* waren für sieben der in dem Gen erhaltenen SNPs HapMap-Daten verfügbar und konnten mit der Haploview Software unter Verwendung des 4-Gameten-Regel Algorithmuses analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass das komplette Gen in der CEU-Population, welche aus Einwohnern Utahs mit europäischen Vorfahren besteht, einen Haplotypblock von Polymorphismus rs3784246 bis Polymorphismus rs11636117 bildet, also ein Kopplungsungleichgewicht aufweist (siehe Abbildung 3.23).





**Abbildung 3.23: Haplotypstruktur für einen 20 kb großen Bereich um *C15orf2***

Die Haplotypblöcke sind mit schwarzen Linien umrahmt. Eine schematische Darstellung von *C15orf2* befindet sich über den darin befindlichen SNPs. Jedes Quadrat zeigt einen paarweisen Vergleich zwischen den zwei entsprechenden Polymorphismen auf. Die Werte des Kopplungsungleichgewichtes  $D'$  ( $\times 100$ ) sind in den Quadranten angegeben. Rote Quadrate kennzeichnen ein statistisch signifikantes Kopplungsungleichgewicht mit einem Wert für  $D' = 1$ , blaue Quadrate einen  $D'$ -Wert = 1 ohne statistische Signifikanz. Hellrote und rosa Quadrate zeigen eine  $D'$ -Wert von  $< 1$  mit statistischer Signifikanz auf, weiße Quadrate ohne statistische Signifikanz. *C15orf2* befindet sich in einem Haplotypblock von  $\sim 6$  kb. Ein  $\sim 3$  kb großer Bereich vor dem Gen bildet einen eigenen Haplotypblock.

### 3.2.3.2 Ermittlung von komplexen Haplotypen von *C15orf2*

Um mögliche Hinweise auf eine positive Selektion des Gens *C15orf2* zu erhalten, wurde an DNA von PWS- und AS-Deletionspatienten eine Bestimmung der Sequenzvarianten zur Ermittlung der unterschiedlichen Haplotypen von *C15orf2* durchgeführt. Diese Patienten besitzen aufgrund einer großen *de novo* Deletion des Bereiches 15q11q13 nur eine Kopie des Gens, was eine experimentelle Bestimmung des Haplotyps ohne Kenntnis der elterlichen Haplotypen möglich macht. Insgesamt wurden die Haplotypen von 182 Patienten bestimmt, 113 PWS-Patienten und 69 AS-Patienten. Zur Analyse wurden drei SNPs (rs3784246,

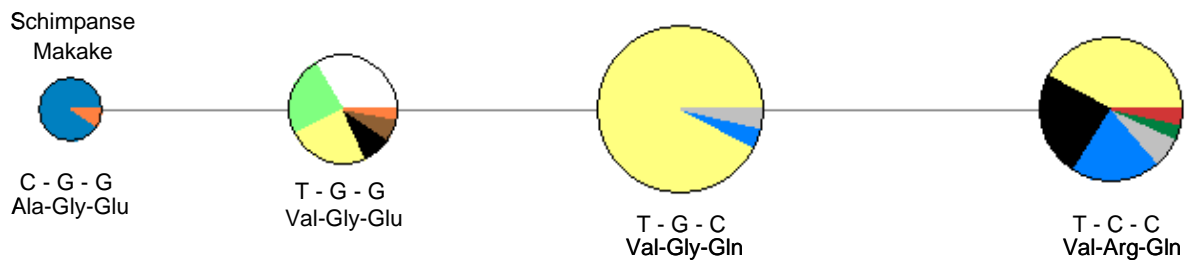
rs1563102, rs3742950) ausgewählt, die sich in vorherigen Genotypisierungsstudien (Quellen: NCBI, HapMap) als informativ in der europäischen Population erwiesen haben (Allelfrequenzen: rs3784246: (T) 0,917/(C) 0,083; rs1563102: (C) 0,3/(G) 0,7; rs3742950: (C) 0,336/(G) 0,664). Die SNPs sind nichtsynonym, das bedeutet, sie führen eine Veränderung in der Aminosäuresequenz des Proteins herbei, und könnten so evolutionsbiologisch im Falle einer positiven Selektion eine Rolle spielen. Die Nukleotide dieser SNPs wurden durch TaqMan Genotyping Assays der Firma ABI bestimmt, die verwendeten Assays sind im Anhang auf Seite 105 aufgeführt. Zusätzlich wurden in allen Patienten zwei Tetranukleotidwiederholungssequenzen (*short tandem repeats*, STRs) im 3'UTR des Gens analysiert. Diese besitzen in der Regel eine höhere Mutationsrate als SNPs. Hierbei handelt es sich um die Tetranukleotidwiederholungssequenzen an den Positionen nt4099 (GTTT<sub>n</sub>) und nt5898 (GATA<sub>n</sub>) der *C15orf2*-Referenzsequenz AF179681. Die Analyse erfolgte hierbei durch eine Fragmentlängenbestimmung mittels Genescan, verwendet wurden jeweils die im Anhang auf Seite 104 aufgeführten Primer.

Bei der Auswertung konnten insgesamt vier verschiedene Haplotypen (CGG, TGG, TGC, TCC) bestimmt werden, von denen zwei mit einer Häufigkeit von 43% (TGC) und 32% (TCC) stark über den zwei weniger häufig vertretenen (18% (TGG) und 6% (CGG)) dominieren. Durch Vergleich der Schimpansen- und Makakensequenz, die in der NCBI Datenbank eingesehen werden kann, ließ sich der Haplotyp CGG als der mögliche ancestraler Haplotyp bestimmen. Dieser trat mit einer Häufigkeit von 6% am seltensten auf.

Anschließend wurden die Allele der STRs mit den Haplotypen der SNPs in Verbindung gebracht. In der Tabelle 7.1 im Anhang auf Seite 106ff sind die erhaltenen Rohdaten aufgeführt.

Um die Beziehungen der SNPs und STRs untereinander zu untersuchen und Hinweise auf eine evolutionäre Entwicklung zu erhalten, wurden die Daten mit dem Programm Network (<http://www.fluxus-engineering.com>, Version 4.510) unter Verwendung des Median Joining Algorithmuses ausgewertet (Abbildung 3.24).





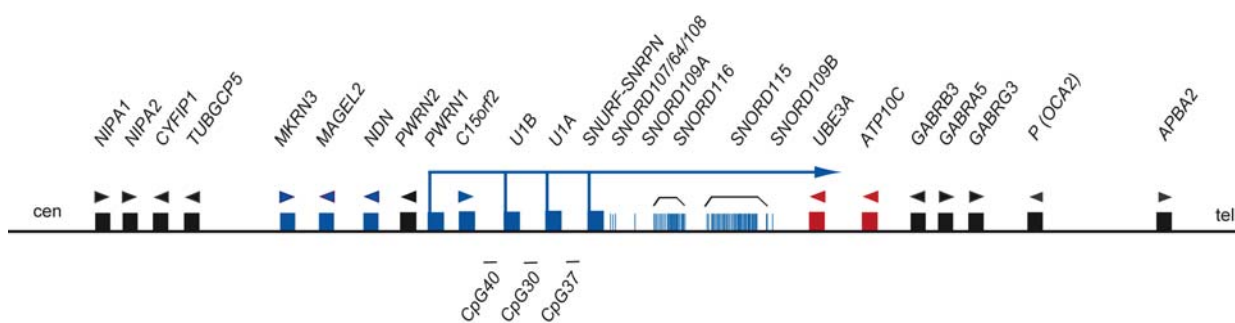
**Abbildung 3.24: Hypothetische Entwicklung der Haplotypen von *C15orf2***

Jeder Kreis repräsentiert einen SNP-Haplotypen, die Nukleotide der SNPs und die entsprechenden Aminosäuren des Proteins sind unter den Kreisen beschrieben (rs3784246 - rs1563102 - rs3742950), der Haplotyp von Schimpanse und Makake ist eingezeichnet. Als Sektoren innerhalb der Kreise sind die vorkommenden STR-Haplotypen dargestellt. Die Fläche jedes Kreises, bzw. die jedes Sektors ist proportional zu der Frequenz des jeweiligen Haplotyps in der untersuchten Population. Anzahl der Wiederholungen der jeweiligen STRs (nt4099 – nt5898): dunkelblau 8 – 11, orange 8 – 12, hellgrün 5 – 12, gelb 8 – 7, weiß 5 – 11, braun 6 – 8, schwarz 7 – 7, hellblau 6 – 7, grau 9 – 7, dunkelgrün 8 – 8, rot 7 – 8

Die Auswertung zeigt eine potentielle evolutionäre Entwicklungsreihe der SNP-Haplotypen von dem vermutlich ancestralen Haplotypen, der auch in der Schimpansen- und Makakensequenz zu finden ist, zu den anderen Haplotypen, wobei sich jeweils ein Nukleotid verändert. Auffällig ist hierbei, dass sich zwei der in der möglichen Evolutionsreihe (Abbildung 3.24) dem vermutlich ancestralen Haplotyp folgenden Haplotypen in jeweils sechs verschiedene STR-Haplotypen aufspalten. Ein SNP-Haplotyp, der in der möglichen Evolutionsreihe an dritter Stelle steht und in der untersuchten Population am häufigsten vorkommt, spaltet sich in nur drei STR-Haplotypen auf. Von diesen STR-Haplotypen ist einer auffällig stark dominierend vertreten (8 – 7, in der Abbildung 3.15 gelb dargestellt). 92 % aller Individuen dieses SNP-Haplotyps besitzen diesen STR-Haplotyp.

## 4. Diskussion

Die PWS/AS-Genregion auf dem langen Arm von Chromosom 15 unterliegt dem genomischen Imprinting. Die meisten Gene dieser Region werden ausschließlich vom väterlichen Chromosom exprimiert, die Gene *UBE3A* und *ATP10C* ausschließlich vom mütterlichen Chromosom (Abbildung 4.1). Störungen in der elternspezifischen Expression dieser Gene resultieren in der Ausbildung des Prader-Willi-Syndroms oder des Angelman-Syndroms. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte eine genauere Analyse des Expressionsverhaltens der paternal exprimierten Gene *PWRN1*, *C15orf2* und des *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptes erfolgen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob *C15orf2*-mRNA tatsächlich translatiert wird und das entsprechende Protein detektiert und näher charakterisiert werden, um mögliche Hinweise auf eine Funktion dieses Proteins und eine mögliche Beteiligung am PWS-Phänotyp zu erhalten.



**Abbildung 4.1: Schematische Übersicht der chromosomalen Region 15q11q13.**

Paternal exprimierte Gene sind als blaue Kästchen dargestellt, die *SNORD*-Gene als blaue Striche. Maternal exprimierte Gene sind als rote Kästchen dargestellt, biallelisch exprimierte Gene als schwarze Kästchen. Pfeilspitzen oberhalb der Gene kennzeichnen die Transkriptionsrichtung. CpG, analysierte CpG-Islands innerhalb der Region; cen, Centromer; tel, Telomer.

### 4.1 *PWRN1* ist Teil der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit und wird paternal exprimiert

Das im Jahre 2007 identifizierte Gen *PWRN1* der PWS/AS-Genregion besteht aus 26 Exons, besitzt aber keine proteincodierenden Eigenschaften (Buiting *et al.*, 2007). Das 3'Ende des Gens ist etwa 23 kb von *C15orf2* entfernt (siehe Abbildung 4.1).

In dieser Arbeit konnten durch eine *Exon-Connection*-PCR Exons von annotierten EST-Klonen als weitere, stromabwärts des Exon 26 liegende neue Exons von *PWRN1*, von denen eins alternativ genutzt wird, identifiziert und verifiziert werden. Es wurden somit zusätzliche neue Spleißvarianten von *PWRN1* nachgewiesen und gezeigt, dass das Gen *C15orf2* in einem Intron von *PWRN1* lokalisiert ist.

Interessanterweise liegt das am weitesten telomerisch gelegene neue Exon von *PWRN1* nur 285 bp von dem Upstream-Exon und alternativen Startexon *UIB* der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit entfernt. Durch eine *Exon-Connection*-PCR in cDNA aus fetalem Gehirn und aus Testis konnten die neuen *PWRN1*-Exons mit dem Upstream-Exon *U5* der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit verbunden werden. Außerdem konnte in Testis ein weiteres, bislang unbekanntes alternatives Exon identifiziert werden. Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das Gen *PWRN1* einen weiteren Transkriptionsstartpunkt der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit darstellt.

In bislang durchgeführten Expressionsanalysen konnten für *PWRN1* eine biallelische Expression in Testis und eine monoallelische Expression in fetalem Gehirn nachgewiesen werden (Buiting *et al.*, 2007). Jedoch war nicht bekannt, von welchem elterlichen Allel die monoallelische Expression erfolgte. Durch die vorhergehenden Ergebnisse war anzunehmen, dass *PWRN1* als Teil der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit im fetalen Gehirn ebenfalls vom paternalen Allel exprimiert wird. Im Verlauf dieser Arbeit konnte dies tatsächlich anhand von DNA und RNA-Proben aus dem Großhirn eines Feten und peripherer Blut-DNA der Eltern bestätigt werden. Die Expression von *PWRN1* erfolgt in fetalem Gehirn eindeutig ausschließlich vom paternalen Allel.

#### **4.2 Die Transkripte der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit und weiterer epigenetisch relevanter Gene werden in bestimmten Stadien der männlichen Keimbahn spezifisch exprimiert**

In dieser Arbeit sollte das Expressionsmuster der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte in der männlichen Keimbahn näher untersucht werden und versucht werden, mögliche epigenetische Faktoren zu identifizieren, die in die männliche Keimzellentwicklung involviert sein könnten. Dazu wurden Genexpressionsdaten ausgewertet, die aus Testisbiopsaten von fertilen Männern sowie infertilen Männern erstellt wurden. Die infertilen Männer wiesen eine vorzeitige

Arretierung in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese auf, die sich in einem unterschiedlichen Gehalt an Keimzellen verschiedener Stadien im Testisgewebe äußerten.

Die Daten wurden von Andrej-Nikolai Spieß aus der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit Affymetrix GeneChips erstellt und uns zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt (Spiess *et al.*, 2007). Die GeneChip-Analyse hat beispielsweise gegenüber einer RNA-*in situ*-Hybridisierung den Vorteil, dass nur geringe Mengen an Testisbiopsien gebraucht werden, um die Expression einer großen Anzahl von Genen des menschlichen Genoms zu untersuchen.

Dass die Daten der Quantifizierung des mRNA-Gehalts in Gewebe über eine Microarray-basierte Analyse durchaus reell sind, konnte schon in der Studie von Spiess *et al.*, (2007) gezeigt werden. In 19 von 20 getesteten Genen konnten die in den Affymetrix GeneChip Arrays erhaltenen Expressionsdaten über eine quantitative RT-PCR-Analyse verifiziert werden. Für die Validierung der in dieser Arbeit beschriebenen Genexpressionsdaten wurden diese mit Daten verglichen, die durch eine unabhängige Analyse mit einem anderem Arraysystem, einer Single-Oligonukleotid basierten Microarray Plattform (Codelink<sup>TM</sup> Human 20K Bioarray, GE Healthcare) ermittelt wurden (Feig *et al.*, 2007). Außer für die Gene *EZH2* und *MBD1* konnten übereinstimmende Expressionsmuster erhalten werden. Diese Abweichungen könnten zumindest im Fall von *MBD1* auf die Existenz unterschiedlicher Isoformen zurückzuführen sein. Je nach Lage der entsprechenden Sondensets wird eine Isoform detektiert, die ein unterschiedliches Expressionsverhalten als die anderen Isoformen des Proteins aufweist. Außerdem deutet auch die Tatsache, dass die Expressionswerte der analysierten Gene bei den einzelnen Individuen innerhalb der unterschiedlichen untersuchten Gruppen jeweils sehr ähnlich sind, darauf hin, dass die Expressionsdaten reell sind. Die einzige Ausnahme bildet die Gruppe der Männer mit Hypospermatogenese. Diese Störung kann sehr unterschiedliche Ursachen haben, die sich in einem unterschiedlichen Expressionsverhalten einiger der untersuchten Gene äußern könnte. Zusätzlich wurden die Daten durch einen Vergleich mit bisher publizierten Ergebnissen aus Analysen der Maus verglichen. Bei den Genen, für die bisher Genexpressionsdaten in der Maus publiziert worden sind, standen die hier beschriebenen Genexpressionsprofile in völliger Übereinstimmung.

Auch die zunächst untersuchten Expressionsdaten der in der Spermatogenese involvierten Gene *SYCP3*, *TNPI*, *PRM1*, *PRM2* zeigten, dass die Affymetrix GeneChips dafür geeignet sind. *SYCP3* (*synaptonemal complex protein 3*) ist in die Paarung der homologen Chromosomen während der Meiose I involviert (Yuan *et al.*, 2000). Wie erwartet erfolgt ein Anstieg der Expression während der Meiose, also mit einem Anstieg der Keimzellen. Die

Gene *TNP1* (*transition protein 1*), *PRM1* und *PRM2* (*protamine 1* und *2*) sind in dem Austausch der Histone zu Protaminen und somit in die DNA-Kondensation und -Verpackung nach der Meiose in den Zellkern der Spermien involviert (Domenjoud *et al.*, 1990; Meistrich *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser Gene wie erwartet erst nach der Meiose ansteigt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expressionsdaten der an der Keimzellentwicklung beteiligten Gene in vollständiger Übereinstimmung mit ihrer Funktion in der Spermatogenese stehen.

Durch diese Analyse war es somit möglich, auf den Verlauf der Genexpression von keimzellspezifischen Genen in der Spermatogenese zurückzuschließen. Es war jedoch nicht möglich, die Genexpression von Genen zu analysieren, die in Keimzellen und in somatischen Zellen exprimiert werden, da die in allen Biopsaten vorhandenen Transkripte aus somatische Zellen Veränderungen der Genexpression in Keimzellen überdecken. Des Weiteren können nur Gene analysiert werden, deren Expression während der Spermatogenese hochreguliert wird. Da jede Biopsie Zellen in verschiedenen, somit auch in früheren Stadien der Keimzellentwicklung enthält, kann eine verminderte Expression in späteren Spermatogenesestadien nicht detektiert werden.

Bei der Analyse der Expressionsdaten von *PWRN1* und *PWRN2* zeigte sich, dass die Expression beider Gene nach der Meiose ansteigt, sie also in postmeiotischen Keimzellen exprimiert werden. Die Expression erfolgt somit vom haploiden Genom nach der Etablierung des paternalen Imprints. Falls die Gene eine Rolle in der männlichen Keimbahn spielen, können sie demnach nicht in die Etablierung des paternalen Imprints involviert sein, sondern eher in die Aufrechterhaltung der offenen Chromatinkonformation des paternalen Allels. Dieses Ergebnis stimmt auch mit der Annahme überein, dass die *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte eine Rolle in der weiblichen Keimbahn spielen, indem sie die Region dort stilllegen (Dittrich *et al.*, 1996; Mapendano *et al.*, 2006). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Arbeit von Chotalia *et al.* 2009, die zeigten, dass Transkription notwendig ist, um die Methylierung von DMRs in der maternalen Keimbahn zu etablieren.

Im Gegensatz zu *PWRN1* und *PWRN2* erfolgt eine verstärkte Expression der mRNA BC035402, die innerhalb der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit zwischen den Upstream-Exons *UIA* und *UIB* lokalisiert ist, schon während der Meiose. Dieses Transkript konnte nicht mit einem der Exons der Transkriptionseinheit verbunden werden, weder durch eine *Exon-Connection-PCR* noch durch eine 5'RACE. Somit bleibt weiterhin unklar, ob BC035402 einen weiteren Teil der Transkriptionseinheit oder ein eigenständiges Gen darstellt. SONDENSETS, die das ursprünglich beschriebene *SNURF-SNRPN*-Gen (Exon 1-10)

detektierten, zeigen eine gleichbleibend starke Expression während der gesamten Spermatogenese.

Um zu untersuchen, welche epigenetischen Faktoren in die Expressionskontrolle der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte involviert sein könnten und wie das mit dem Ablauf der epigenetischen Reprogrammierung während der Spermatogenese im Zusammenhang steht, wurden die Expressionsmuster mehrerer Gene untersucht, die eine Rolle in der Regulation epigenetischer Prozesse spielen. Die erhaltenen Ergebnisse stimmten hierbei mit zuvor publizierten Daten in der Maus und/oder im Menschen überein und erweiterten diese zum Teil. Es konnte bestätigt werden, dass der Transkriptionsfaktor *CTCF* (*CCCTC-binding factor-like*) im Menschen keimzellspezifisch ist und ein Anstieg der Expression vor der Meiose erfolgt. Wie schon von Loukinov *et al.* (2002) in der Maus gezeigt, schließt die Expression von *CTCF* und des paralogen Gens *CTCF* sich gegenseitig während der Keimzellentwicklung in der männlichen Keimbahn aus. Die Ausradierung der DNA-Methylierung während der männlichen Keimzellentwicklung ist gekoppelt mit einem erheblichen Anstieg der Expression von *CTCF* und einem Abfall der Expression von *CTCF*. Dies lässt vermuten, dass *CTCF* in die epigenetische Reprogrammierung in der männlichen Keimbahn involviert ist.

Das Gen *SUV39H2* (*suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)*) codiert für eine testisspezifische Methyltransferase, die verwandt ist mit *SUV39H1* und spezifisch das Histon 3 an der Position Lysin 9 methyliert. Es konnte ein Anstieg der Expression von *SUV39H2* während der Meiose beobachtet werden. Dies ist übereinstimmend mit den Daten von O'Carroll *et al.* (2000), die durch Immunolokalisation eine vermehrte Verteilung des murinen *Suv39h2*-Proteins am Heterochromatin während der Spermatogenese vom Leptotänstadium der Meiose bis zur Bildung der runden Spermatiden nachweisen konnten.

*BRDT* (*bromodomain, testisspecific*) ist ein testisspezifisches Mitglied der BET-Untergruppe (*bromodomain containing proteins with extra terminal motif*) einer Familie von Proteinen mit Bromodomänen-Motiv. Diese Domäne bindet acetylierte Lysine und wird mit Chromatin-Remodelierung in Verbindung gebracht. Shang *et al.*, (2004) konnten in der Maus zeigen, dass die Expression von *BRDT* auf die Keimbahn beschränkt ist, speziell auf pachytäne und diplotäne Spermatozyten und auf frühe Spermatiden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Genexpressionsdaten der Affymetrix GeneChips aus humanen Testis überein, die Expression des Gens steigt während der Meiose an.

*MBD3L1* (*methyl-CpG-binding domain protein 3-like 1*) ist ein Methylcytosin-bindender Transkriptionsfaktor, dessen Expression bislang nur in runden Spermatiden nachgewiesen

werden konnte (Jiang *et al.*, 2002). Dies konnte mit den Genexpressionsdaten der Affymetrix GeneChips bestätigt werden, die Expression von *MBD3L1* stieg erst nach der Meiose an. Somit könnte das Genprodukt eine Rolle in der männlichen Keimzellentwicklung in den postmeiotischen Stadien spielen.

Die Gene *MBD1* und *MBD2* (*methyl-CpG binding domain protein 1 und 2*) codieren weitere Mitglieder der Familie von Proteinen mit Methyl-CpG-bindenden Domänen. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass das Gen *MBD2* mindestens zwei Isoformen des MBD2-Proteins codiert. Eines dieser Isoformen ist eine kürzere, trunkierte Form des Proteins und wird testisspezifisch exprimiert (Hendrich *et al.*, 1998). Sie wird in den Affymetrix GeneChips durch ein anderes Sondenset detektiert als die in den somatischen Geweben und in Testis exprimierte Isoform. Bislang war nicht bekannt, wann die Expression dieser testisspezifischen Isoform erfolgt. Mit den Affymetrix GeneChip-Daten konnte gezeigt werden, dass diese Isoform schon vor der Meiose sehr früh in der Spermatogenese exprimiert wird. Die Funktion von MBD2 konnte bislang noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine Hypothese von Bhattacharya *et al.* (1999) war, dass das Protein als DNA-Demethylase agiert und somit einen Transkriptionsaktivator darstellt. Dies konnte jedoch bislang von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden. Die Daten von Ng *et al.* (1999) sprechen eher dafür, dass *MBD2* als ein Transkriptionsrepressor wirkt. Beide Isoformen besitzen eine Methyl-CpG-bindende Domäne. Aufgrund der Expressionsprofile der Affymetrix GeneChips könnte man spekulieren, dass die trunkierte, testisspezifische Isoform keine Repressoraktivität besitzt und DNA demethyliert. Falls dies zutreffen sollte, könnte diese Isoform in der Ausradierung der DNA-Methylierung in primordialen Keimzellen oder in Spermatogononien beteiligt sein.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass in der männlichen Keimbahn eine Isoform des *MBD1*-Proteins exprimiert wird, die ein alternatives 3' Exon aufweist. Im Gegensatz zu der zuvor erwähnten Isoform von *MBD2* ist diese nicht kürzer als die in den somatischen Geweben exprimierte Form und ist in der männlichen Keimbahn etwas später als die testisspezifische Isoform von *MBD2* nachweisbar. Desweiteren konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*), was für ein Protein der Polycomb Group (PcG)-Proteine codiert und als Transkriptionsrepressor in die Methylierung des Histons H3 am Lysin 27 involviert ist (Cao *et al.*, 2002; Czermin *et al.*, 2002), schon sehr früh in der Spermatogenese exprimiert wird.

Weitere in dieser Arbeit analysierte Gene zeigten im Verlauf der Spermatogenese keine deutlichen quantitativen Veränderungen ihrer Expression oder aber keine detektierbare Expression. Dies stimmt zumindest im Falle von *DNMT3L* nicht mit Mausdaten überein, die

zeigten, dass das Gen dort im Testis exprimiert wird (Aapola *et al.*, 2001). Die nicht nachweisbare Expression des Gens könnte hier durch technische Probleme verursacht worden sein, beispielsweise durch eine falsche Lokalisation der Probesets.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Anstieg der Expression von Genen für mehrere epigenetische Faktoren (Isoformen von *MBD1* und *MBD2*, *MBD3L1*, *SUV39H2*, *BRDT* und *EZH2*) in spezifischen Stadien der menschlichen Spermatogenese erfolgt. Dies lässt vermuten, dass sie eine wichtige Rolle in der epigenetischen Reprogrammierung des Genoms während der Spermatogenese spielen.

#### **4.3 Drei neu identifizierte CpG-Islands in der Region der *SNURF-SNRPN*-Upstream Exons zeigen eine allelspezifische Methylierung**

In der PWS/AS-Genregion werden mehrere Gene, wie z.B. *NDN*, *PWRN1*, *C15orf2* und *SNURF-SNRPN*, nur vom paternalen Chromosom exprimiert (Abbildung 4.1). Diese elternspezifische Expression ist mit einer allelspezifische DNA-Methylierung sogenannter differentiell methylierter Regionen (DMRs) assoziiert. Die DMR im Promotorbereich von *SNURF-SNRPN* ist in dieser Region am Besten untersucht worden. Es konnte an PWS- und AS-Patienten für einzelne CpGs detailliert gezeigt werden, dass diese DMR ein sehr robustes Methylierungsmuster hat. Das maternale Allel liegt in der Regel vollständig methyliert und das paternale Allel vollständig unmethyliert vor (Zeschnigk *et al.*, 1997). Diese stabile Methylierung am *SNURF-SNRPN*-Locus wird in der Routinediagnostik bei PWS und AS seit langem für Methylierungsanalysen genutzt. Eine Methylierungsanalyse des DMR am *NDN*-Locus in Blut-DNA zeigte, dass das paternale Allel nahezu unmethyliert vorliegt, die einzelnen CpGs auf dem maternalen Allel jedoch in ihrer Methylierung sehr variabel sind (Lau *et al.*, 2004). Zwei weitere, nicht mit einem CpG-Island assoziierte DMRs, *UIA* und *UIB*, repräsentieren alternative Startpunkte für die *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte. Methylierungsanalysen dieser beiden DMRs zeigten, dass die CpGs der elterlichen Allele nicht komplett methyliert bzw. unmethyliert vorliegen, sondern hier das maternale Allel teilweise methyliert und das paternale Allel eher unmethyliert vorliegt (Zeschnigk *et al.*, 1997; Färber *et al.*, 1999, Dissertation Corinna Zogel). In den Introns im Bereich von *UIB* und *UIA* konnten drei weitere CpG-Islands identifiziert werden, CpG40, CpG37 und CpG30 (Abbildung 4.1), die im Rahmen dieser Arbeit durch eine Methylierungsanalyse an Blut-DNA von Normalpersonen sowie an DNA eines PWS- und AS-Patienten mit einer großen Deletion



im Bereich 15q11q13 untersucht worden sind. Es konnte gezeigt werden, dass auch diese CpG-Islands differentiell methyliert sind. Entsprechend den schon analysierten DMRs der Region liegt auch hier das paternale Allel an allen drei untersuchten CpG-Islands fast vollständig unmethyliert vor, während das maternale Allel zwar eher methyliert ist, jedoch auch eine Anzahl unmethylierter CpGs aufwies. Somit konnte zwar deutlich eine Tendenz zur Methylierung des maternalen bzw. fehlenden Methylierung des paternalen Allels gefunden werden, diese ist jedoch nicht so eindeutig wie in dem CpG-Island des *SNURF-SNRPN*-Promoterbereichs. Im Gegensatz zu DNA aus peripherem Blut und fetalem Gehirn, wo sowohl eher methylierte als auch eher unmethylierte Allele gefunden wurden, war die DNA aus Spermien bei allen drei untersuchten CpG-Islands vollständig unmethyliert. Das bedeutet, dass das maternale Allel entweder in der Oogenese oder erst postzygot methyliert wird. Da jedoch keine DNA aus Oozyten zur Verfügung stand, konnte dies im Verlauf dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Die Funktion dieser CpG-Islands ist nicht bekannt. Durch ihre Lokalisation in Introns der *SNURF-SNRPN*-Upstream-Exons könnte jedoch spekuliert werden, dass sie in die Expressionskontrolle der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte involviert sind, indem sie über die Methylierung die Expression ausgehend von den bekannten Startexons *UIA* und *UIB* oder von weiteren, bislang noch unbekannten Startexons, beeinflussen.

#### 4.4 Evolutionsbiologische Aspekte und Expressionsanalysen von *C15orf2*

Das Gen *C15orf2* ist distal von *PWRN1* und proximal von der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit lokalisiert (Färber *et al.*, 2000) (Abbildung 4.1). *C15orf2* besitzt, im Gegensatz zu den benachbarten Genen der Region, kein orthologes Gen in der Maus. Dies schließt jedoch nicht aus, dass es wichtige Funktionen in Primaten besitzen könnte. Ein Hinweis darauf liefert die für *C15orf2* berichtete positive Selektion in den phylogenetisch basierten Studien von Nielsen *et al.*, (2005) und Kosiol *et al.*, (2009). In weiteren, populationsgenetisch basierten Studien, die Gene mit partiellen oder kompletten „*Selective Sweep*“ als Resultat einer positiven Selektion (Voight *et al.*, 2006, Williamson *et al.*, 2007) beschreiben, war *C15orf2* nicht aufgefallen. In dieser Arbeit sollte nun durch einen unabhängigen, populationsgenetisch basierten Ansatz untersucht werden, ob weitere Anhaltspunkte für eine positive Selektion von *C15orf2* gefunden werden können. Dazu wurde eine Haplotypanalyse von drei nichtsynonymen SNPs und zwei Tetranukleotid-

wiederholungssequenzen im 3'UTR des Gens an DNA von PWS- und AS-Patienten durchgeführt. Die untersuchten Patienten besitzen eine große Deletion in der Region 15q11q13 und sind somit hemizygot für *C15orf2*. Dadurch konnten die Haplotypen experimentell ohne die Analyse der elterlichen DNA bestimmt werden. Da die Haplotypen auf dem von der Deletion nicht betroffenen Chromosom 15 bestimmt wurden, repräsentieren die gefundenen Haplotypen die von normalen Chromosomen 15 in der Population. Auch konnte gezeigt werden, dass sich *C15orf2* in der kaukasischen Population auf einem geschlossenen Haplotypblock befindet, somit sind Haplotypvariationen aufgrund von Rekombinationsereignissen wenig wahrscheinlich.

Die beiden untersuchten Arten von Polymorphismen besitzen unterschiedliche Mutationsraten. SNPs haben eine Mutationsrate von  $2.5 \times 10^{-8}$  pro Nukleotid pro Generation (Nachman und Crowell, 2000), wohingegen die Mutationsrate von Tetranukleotidwiederholungssequenzen durchschnittlich  $2.1 \times 10^{-3}$  pro Locus pro Generation beträgt (Weber und Wong, 1993). Somit besitzen Tetranukleotidwiederholungssequenzen eine Mutationsrate, die um fünf Größeneinheiten höher ist als die der SNPs. Demnach sollte, wenn das Gen keiner positiven Selektion unterliegt, jeder SNP-Haplotyp eine hohe Anzahl an verschiedenen Tetranukleotidwiederholungssequenzen zeigen. Bei den vier gefundenen SNP-Haplotypen von *C15orf2* war dies nur bei den beiden Haplotypen mit mittlerer Häufigkeit in der untersuchten Population (T-G-G und T-C-C) der Fall. Der SNP-Haplotyp mit der geringsten Häufigkeit (C-G-G), der vermutlich den ancestralen Haplotyp darstellt, und der Haplotyp, der am häufigsten vorkommt (T-G-C), zeigten eine geringe Variabilität der Tetranukleotidwiederholungssequenzen. Auffällig ist, dass 92% der Chromosomen mit dem T-G-C Haplotyp, die etwa 50% aller untersuchten Chromosomen 15 darstellen, denselben Haplotypen an Tetranukleotidwiederholungssequenzen haben (nt4099 – nt5898: 8 -7). Die Anzahl dieses SNP-Haplotyps könnte sich in der untersuchten Population in jüngster Zeit außergewöhnlich schnell vermehrt haben, so dass es noch nicht durch Mutationsereignisse zu einer größeren Variabilität der Tetranukleotidwiederholungssequenzen kommen konnte.

Positive Selektion eines Gens entsteht vor allem durch den Selektionsdruck zur Anpassung an neue Umweltbedingungen. Falls ein SNP-Haplotyp eine bessere Anpassung des Individuums an die Umwelt bedingt, dann würde die Frequenz dieses Haplotyps in einer Population in einer relativ kurzen Zeit ansteigen. Dieses Phänomen würde jedoch auch bei einem Populations-*Bottleneck* auftreten. Dabei kommt es zu einer Reduzierung der Anzahl an verschiedenen Haplotypen im gesamten Genom. Jedoch lassen sich in genomweiten Analysen keine Hinweise auf ein in jüngster Zeit erfolgtes Populations-*Bottleneck* in der Population

finden (Voight *et al.*, 2006, Williamson *et al.*, 2007). Somit sind die Daten dieser Analyse durchaus kompatibel mit einer positiven Selektion von *C15orf2*.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem Gene positiver Selektion unterliegen, die in Sinneswahrnehmungen, Immunsystem und Reproduktion involviert sind (Nielsen *et al.*, 2005). Bislang können noch keine Aussagen über die Funktion von *C15orf2* getroffen werden, jedoch beinhaltet das Gen mehrere Sequenzen für piRNAs, die durch Interaktion mit Proteinen der Piwi-Familie in die Spermatogenese involviert sein sollen (Aravin *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006; Grivna *et al.*, 2006). Dies lässt sich gut mit einer zunächst berichteten testispezifischen Expression von *C15orf2* vereinbaren (Färber *et al.*, 2000). Mittlerweile konnte jedoch auch eine Expression in fetalem Gehirn nachgewiesen werden (Buiting *et al.*, 2007). Um zu untersuchen ob *C15orf2* in weit mehr Geweben exprimiert wird, als zunächst angenommen, wurde im Verlauf dieser Arbeit eine RT-PCR-Analyse an RNA aus verschiedenen humanen Geweben durchgeführt. Im Gegensatz zu der in 2000 durchgeführten Northern-Blot-Analyse konnte eine Expression des Gens in 13 von 14 getesteten Geweben, neben Testis und fetalem Gehirn beispielsweise auch in adultem Gehirn, Leber, Herz, Prostata und Plazenta nachgewiesen werden. Nur an RNA aus Blut konnte keine Expression detektiert werden. Diese Diskrepanz zu der zunächst angenommenen testisspezifischen Expression könnte durch die höhere Sensitivität der RT-PCR-Analyse im Vergleich zu einer Northern-Blot-Analyse erklärt werden, so dass auch eine Expression detektiert werden kann, wenn diese unter einem kritischen Schwellenwert einer Northern-Blot-Analyse liegt.

*C15orf2* liegt in einem Cluster paternal exprimierter Gene (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *PWRN1-SNURF-SNRPN*). Es konnte schon zuvor eine monoallelische Expression des Gens in fetalem Gehirn nachgewiesen werden (Buiting *et al.*, 2007), und im Verlauf dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob diese auch vom paternalen Allel erfolgt. Anhand der Genotypisierung von vier Nukleotidwiederholungssequenzen in DNA- und RNA-Proben aus dem Gehirn eines Feten und DNA-Proben aus peripherem Blut der Eltern konnte in dieser Arbeit tatsächlich auch, wie erwartet, eine paternale Expression von *C15orf2* nachgewiesen werden. Da eine monoallelische Expression in der Regel mit einer differentiellen DNA-Methylierung assoziiert ist, wurde eine Methylierungsanalyse des CpG-Islands von *C15orf2* an DNA aus fetalem Gehirn durchgeführt. Dazu wurden zwei Bereiche analysiert. Der Bereich im 5'UTR des Gens zeigte eine komplette Methylierung aller CpGs, während in dem Bereich stromabwärts des Startcodons, der auch die schon zuvor von Färber *et al.* (2000) analysierte *SacII*-Schnittstelle beinhaltet, sowohl methylierte als auch unmethylierte CpGs

gefunden werden konnten. Bei den Klonen, die von tendenziell unmethylierten DNA-Sequenzen abstammen, waren die CpGs 1, 2 und 6 jedoch immer methyliert. Dieses Ergebnis spricht für eine differentielle Methylierung eines Teils des CpG-Islands und stimmt mit der gefundenen paternalen Expression überein. Es widerspricht jedoch den Ergebnissen von Färber et al., 2000, die methylierungssensitive Southern-Blot-Analysen durchgeführt haben und von einer kompletten Methylierung der *SacII*-Schnittstelle in DNA aus humanem Gehirn berichtet haben. Diese Diskrepanz könnte zum einen durch technische Probleme bei der Durchführung der Southern-Blot-Analysen erklärt werden, zum anderen könnte es sich um einen entwicklungsspezifischen Effekt handeln, da nicht bekannt ist, ob die damals analysierte DNA aus fetalem oder adultem Gehirngewebe stammte. Falls sie aus adultem Gehirn stammte, könnte dies die unterschiedlichen Methylierungsergebnisse der *SacII*-Schnittstelle erklären, stünde jedoch im Widerspruch zu den durchgeführten immunhistologischen Färbungen in Gewebeschnitten aus humanen adulten Gehirn, die *C15orf2* in Neuronen im Hypothalamus detektierten, und der schon diskutierten RT-PCR-Analyse, die eine Expression von *C15orf2* in adultem Gehirn nachweist. Falls eine Methylierung des CpG-Islands von *C15orf2* in adultem Gehirn vorliegt, würde man vermuten, dass das Gen in diesem Gewebe nicht exprimiert wird und somit kein Protein und keine mRNA detektierbar sind. Das Protein wurde jedoch nur in einigen wenigen Neuronen nachgewiesen und auch nicht in Gliazellen. Falls die damals analysierte DNA vorwiegend aus Gliazellen und *C15orf2*-negativen Neuronen stammt, könnte der Gehalt an DNA aus *C15orf2*-positiven Neuronen zu gering sein, um eine unmethylierte *SacII*-Schnittstelle in dieser DNA mit einer Southern-Blot-Analyse zu detektieren.

Aufgrund der neuen Ergebnisse zur Expression von *C15orf2* wurde untersucht, ob die *C15orf2*-mRNA tatsächlich in ein Protein translatiert wird und wo dieses Protein lokalisiert ist. Unter der Verwendung eines spezifischen anti-*C15orf2*-Antikörpers und einer Western-Blot-Analyse konnte ein Protein der erwarteten Größe im Cortex, Putamen, Nucleus caudatus und Hypothalamus nachgewiesen werden. Die Spezifität des hierbei verwendeten Antikörpers wurde durch Western-Blot-Analysen an HEK-293- und HeLa-Zellen, die das Protein transient überexprimieren, nachgewiesen. Es konnte nur eine Bande der erwarteten Größe bei den mit einem Expressionsplasmid für *C15orf2* transfizierten Zellen detektiert werden. Da das überexprimierte Protein mit einem FLAG-Tag versehen ist, wurden weitere Western-Blot-Analysen als Kontrollen mit einem anti-FLAG-Antikörper durchgeführt. Die ebenfalls nur bei transfizierten Zellen detektierten Banden migrierten im gleichen Bereich wie die mit dem für *C15orf2*-spezifischen Antikörper erhaltenen Banden, was wiederum auf eine spezifische

Bindung des anti-C15orf2-Antikörpers hindeutet. Interessanterweise konnte kein C15orf2-Protein in Testis nachgewiesen werden, obwohl die zuvor durchgeführten Northern-Blot- und RT-PCR-Analysen eine Expression des Gens in diesem Gewebe zeigten. Es konnte nur eine starke Bande bei etwa 60 kDa detektiert werden, die auch bei transfizierten sowie untransfizierten HeLa-Zellen detektiert werden konnte. Die Identität der Bande konnte nicht geklärt werden, es könnte sich sowohl um eine spezifische Isoform des Proteins als auch um degradiertes Protein handeln. Auch kann eine unspezifische Bindung des Antikörpers nicht komplett ausgeschlossen werden. Falls es sich hierbei um eine fehlende Translation der *C15orf2*-mRNA in Testis handelt, könnte dies durch eine gewebsspezifische negative Translationskontrolle durch Wechselwirkungen von Proteinen mit Sequenzen der mRNA erklärt werden. So kann z.B. die Assoziation der mRNA mit den Ribosomen verhindert werden. Dies tritt im Falle der *ferritin*- und der *erythroid 5-aminolevulinate Synthase* (eALAS)-mRNA auf (Gray und Hentze, 1994; Muckenthaler *et al.*, 1998). Ein Repressorprotein (*iron regulatory protein*, IRP) bindet im Falle einer geringen Eisenkonzentration im Cytosol an eine „stem-loop“-Struktur im 5'UTR, dem „*iron responsive element*“ (IRE) (Aziz und Munro, 1987; Leibold und Munro, 1988), wodurch eine Translation verhindert wird (Gray *et al.*, 1993).

In den durchgeführten Western-Blot-Analysen war auffällig, dass die Bande des in verschiedenen Gehirnregionen detektierten endogenen Proteins etwas höher war als die des überexprimierten Proteins in den transfizierten Zellen. Dies könnte auf eine gewebespezifische posttranslationale Modifikation des Proteins hindeuten.

Die Detektion von C15orf2 im Hypothalamus konnte zusätzlich noch durch immunhistologische Färbungen und *in situ*-Hybridisierungen von humanen Gehirnschnitten verifiziert werden. Diese Untersuchungen sind am Institut für Neurowissenschaften der Royal Netherlands Academy of Arts and Science, Amsterdam, von U. Unmehopa und D. Swaab durchgeführt worden. In diesen Färbungen konnte das Protein bzw. die entsprechende mRNA hauptsächlich im Cytoplasma detektiert werden, vermutlich im Bereich der Nissl-Substanz, die einen Bereich mit stark ausgeprägten Endoplasmatischen Retikulum und somit intensiver Proteinsynthese darstellt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die immunhistologische Färbung spezifisch ist, da bei Western-Blot-Analysen mit Proteinextrakten aus dem Hypothalamus mit dem C15orf2-spezifischen Antikörper nur eine Bande in der erwarteten Größe detektiert werden konnte. Die Lokalisation von C15orf2 im Hypothalamus ist höchst interessant, da vermutet wird, dass Funktionsstörungen des Hypothalamus für einen Teil der Symptome von PWS verantwortlich sind (Swaab, 1997).

Bei der Überexpression von C15orf2 in HeLa- und HEK-293-Zellen konnte eine überwiegende Lokalisation des Proteins im Zellkern beobachtet werden. Dies konnte schon zuvor aufgrund von sechs potentiellen nukleären Lokalisationssignalen des Gens durch eine bioinformatische Analyse mit der Software PSORTII *in silico* vorhergesagt werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den histologischen Färbungen an Gehirnschnitten, in denen C15orf2 vor allem im Cytoplasma detektiert werden konnte. Bislang kann noch keine Erklärung dafür gegeben werden, aber es ist bekannt, dass im Falle der nukleären Steroidrezeptoren die Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  in Nagern und im Zellmodell fast ausschließlich im Zellkern gefunden werden können, in humanem postmortalem Gewebe jedoch vor allem im Cytoplasma detektiert werden können (Kruijver *et al.*, 2003). Eine weitere Erklärung könnte eine Regulation der intrazellulären Lokalisation durch spezifische posttranslationale Modifizierung sein. Ein solcher Mechanismus ist z.B bei den Stat-Proteinen (*signal transducers and activators of transcription*) bekannt, die als Transkriptionsfaktoren an Zellwachstum und Proliferation beteiligt sind. Diese sind unphosphoryliert im Cytoplasma lokalisiert, wohingegen sie im phosphoryliertem Zustand im Zellkern zu finden sind (Ihle, 1996). Wie bereits diskutiert sind für C15orf2 Hinweise auf eine postrtranslationale Modifikation bei der Durchführung der Western-Blot-Analysen gefunden worden, so könnte ein solcher, gewebespezifisch kontrollierter Mechanismus durchaus eine Erklärung für die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation im Zellkulturmodell und im Gewebe sein.

Zur Funktion des Proteins kann bislang noch keine Aussage gemacht werden, da die Aminosäuresequenz von C15orf2 keine Ähnlichkeiten mit bisher bekannten Proteinmotiven aufweist. Der Nachweis einer positiven Selektion zeigt jedoch, dass das Gen eine essentielle Bedeutung im humanen Organismus haben muss, die nun in weiterführenden funktionellen Studien untersucht werden muss.

## 5. Zusammenfassung

Die Prader-Willi-/Angelman-Genregion auf Chromosom 15 unterliegt dem genomischen Imprinting und enthält Gene, die nur auf dem paternalen oder maternalen Chromosom aktiv sind. Ein Funktionsverlust der paternal exprimierten Gene dieser Region kann zur Ausprägung des Prader-Willi-Syndroms führen, ein Funktionsverlust des maternal exprimierten Gens *UBE3A* führt zum Angelman-Syndrom. Die monoallelische Expression der paternal exprimierten Gene wird durch eine elternspezifische Methylierung in differentiell methylierten Regionen (DMRs) reguliert. In dieser Arbeit konnten weitere DMRs innerhalb der Region nachgewiesen werden, die eine Hypermethylierung des paternalen und eine Hypomethylierung des maternalen Allels aufwiesen.

Desweiteren wurde das Expressionsverhalten zweier paternal exprimierter Gene der chromosomalen Region 15q11q13 genauer untersucht. Die Gene *C15orf2* und *PWRN1* sind innerhalb eines Clusters paternal exprimierter Gene lokalisiert. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass beide Gene in fetalem Gehirn ausschließlich vom paternalen Chromosom exprimiert werden. Für *PWRN1* konnte gezeigt werden, dass dieses Gen einen weiteren alternativen Transkriptionsstartpunkt der *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit darstellt.

Die Expression der Transkripte dieser Transkriptionseinheit wurde in der männlichen Keimbahn anhand von Expressionsdaten von Testisgewebe fertiler und infertiler Männer untersucht, die über eine Affymetrix GeneChip Array Analyse in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erhoben wurden. Dadurch konnte das Expressionsverhalten von Genen in den verschiedenen Stadien der Spermatogenese analysiert werden. Es wurde festgestellt, dass die *IC-SNURF-SNRPN*-Transkripte postmeiotisch exprimiert werden, und somit nicht in die Etablierung des paternalen Imprints involviert sein können. Auch konnten mehrere epigenetisch relevante Faktoren identifiziert werden, die vermutlich in die Spermatogenese involviert sind.

Für *C15orf2* wurden bislang noch keine weiteren Analysen zur Charakterisierung des entsprechenden Proteins durchgeführt. In dieser Arbeit konnte das Protein in mehreren Gehirnregionen einschließlich dem Hypothalamus nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise, dass Funktionstörungen des Hypothalamus für Symptome des PWS verantwortlich sind. In zwei phylogenetisch basierten Studien wurde eine positive Selektion von *C15orf2* beschrieben. In dieser Arbeit konnten weitere Hinweise auf eine positive Selektion mittels einer Haplotypanalyse, einem populationsgenetisch basierten Ansatz, erhalten werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aapola U, Lyle R, Krohn K, Antonarakis SE, Peterson P (2001) Isolation and initial characterization of the mouse Dnmt3l gene. *Cytogenet Cell Genet* **92**: 122-126
- Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanaach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL (1997) Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* **17**: 75-78
- Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* **65**: 370-386
- Angelman H (1965) Puppet children: A report of three cases. *Dev Med Neurol* **7**: 681-688.
- Angulo M, Castro-Magana M, Uy J, Rosenfeld W (1992) Growth hormone evaluation and treatment in Prader-Willi syndrome. Nato ASI Series (Ed. by S. B. Cassidy) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, *Cell Biol* **61**: 171-174.
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**: 203-207
- Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA (2001) A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* **10**: 1475-1483
- Aziz N, Munro HN (1987) Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8478-8482
- Bachellerie JP, Cavaille J (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci* **22**: 257-261
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 37-48
- Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N (1991) The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* **349**: 84-87
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**: 263-265.
- Bean CJ, Schaner CE, Kelly WG (2004) Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* **36**: 100-105



- Bell AC, West AG, Felsenfeld G (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**: 387-396
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397**: 579-583
- Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T, Krajewska-Walasek M, Horsthemke B, Brannan CI (2000) De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat Genet* **25**: 74-78
- Boccaccio I, Glatt-Deeley H, Watrin F, Roeckel N, Lalande M, Muscatelli F (1999) The human MAGEL2 gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. *Hum Mol Genet* **8**: 2497-2505
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**: 2536-2539
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* **9**: 395-400
- Buiting K, Dittrich B, Ende S, Horsthemke B (1997) Identification of novel exons 3' to the human SNRPN gene. *Genomics* **40**: 132-137
- Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Farber C, Buchholz T, Smith E, et al. (1998a) Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* **63**: 170-180
- Buiting K, Farber C, Kroisel P, Wagner K, Brueton L, Robertson ME, Lich C, Horsthemke B (2000) Imprinting centre deletions in two PWS families: implications for diagnostic testing and genetic counseling. *Clin Genet* **58**: 284-290
- Buiting K, Greger V, Brownstein BH, Mohr RM, Voiculescu I, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1992) A putative gene family in 15q11-13 and 16p11.2: possible implications for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5457-5461
- Buiting K, Gross S, Ji Y, Senger G, Nicholls RD, Horsthemke B (1998b) Expressed copies of the MN7 (D15F37) gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet Cell Genet* **81**: 247-253
- Buiting K, Gross S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B (2003) Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* **72**: 571-577

- Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B (1999) A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* **105**: 665-666
- Buiting K, Nazlican H, Galetzka D, Wawrzik M, Gross S, Horsthemke B (2007) C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics* **89**: 588-595
- Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* **9**: 395-400
- Burger J, Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Sperling K, Horsthemke B, Reis A (1997) Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **61**: 88-93
- Butler MG (1990) Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet* **35**: 319-332
- Butler MG, Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Thompson T (2004) Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics* **113**: 565-573
- Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG (1986) Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **23**: 793-809
- Butler MG, Palmer CG (1983) Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* **1**: 1285-1286
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**: 1039-1043
- Cattanach BM, Kirk M (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**: 496-498
- Cavaille J, Bachellerie JP (1996) Processing of fibrillarin-associated snoRNAs from pre-mRNA introns: an exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure. *Biochimie* **78**: 443-456
- Chamberlain SJ, Brannan CI (2001) The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine Ube3a antisense transcript but represses paternal Ube3a. *Genomics* **73**: 316-322
- Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N, Dawson C, Lucifero D, Frontera M, James K, Dean W, Kelsey G (2009) Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes Dev* **23**: 105-17.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH (1999) Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* **8**: 1025-1037

- Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH (1995) Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* **57**: 40-48
- Cotter PD, Kaffe S, McCurdy LD, Jhaveri M, Willner JP, Hirschhorn K (1997) Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet* **70**: 74-79
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**: 185-196
- de Smith AJ, Purmann C, Walters RG, Ellis RJ, Holder SE, Van Haelst MM, Brady AF, Fairbrother UL, Dattani M, Keogh JM, Henning E, Yeo GS, O'Rahilly S, Froguel P, Farooqi IS, Blakemore AI (2009) A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet* **18**: 3257-3265
- DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**: 849-859
- DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW (1998) Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci* **18**: 8505-8514
- Ding F, Li HH, Zhang S, Solomon NM, Camper SA, Cohen P, Francke U (2008) SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. *PLoS One* **3**: e1709
- Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls RD, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1996) Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nat Genet* **14**: 163-170
- Domenjoud L, Nussbaum G, Adham IM, Greeske G, Engel W (1990) Genomic sequences of human protamines whose genes, PRM1 and PRM2, are clustered. *Genomics* **8**: 127-133
- Eiholzer U, l'Allemand D, van der Sluis I, Steinert H, Gasser T, Ellis K (2000) Body composition abnormalities in children with Prader-Willi syndrome and long-term effects of growth hormone therapy. *Horm Res* **53**: 200-206
- El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, Walter J, Horsthemke B (2001) Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* **27**: 341-344

- Farber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B (1999) The chromosome 15 imprinting centre (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of SNRPN that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC microdeletion. *Hum Mol Genet* **8**: 337-343
- Farber C, Gross S, Neesen J, Buiting K, Horsthemke B (2000) Identification of a testis-specific gene (C15orf2) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* **65**: 174-183
- Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN (2007) A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* **13**: 33-43
- Fragapane P, Prislei S, Michienzi A, Caffarelli E, Bozzoni I (1993) A novel small nucleolar RNA (U16) is encoded inside a ribosomal protein intron and originates by processing of the pre-mRNA. *Embo J* **12**: 2921-2928
- Frohman, M. A. (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol* **218**: 340-356.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T (2003) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* **278**: 4035-4040
- Fulmer-Smentek SB, Francke U (2001) Association of acetylated histones with paternally expressed genes in the Prader-Willi deletion region. *Hum Mol Genet* **10**: 645-652
- Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**: 799-809
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282
- Gerard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL (1999) Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* **23**: 199-202
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* **442**: 199-202
- Glenn CC, Nicholls RD, Robinson WP, Saitoh S, Niikawa N, Schinzel A, Horsthemke B, Driscoll DJ (1993) Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet* **2**: 1377-1382
- Gray NK, Hentze MW (1994) Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *Embo J* **13**: 3882-3891
- Gray NK, Quick S, Goossen B, Constable A, Hirling H, Kuhn LC, Hentze MW (1993) Recombinant iron-regulatory factor functions as an iron-responsive-element-binding protein, a translational repressor and an aconitase. A functional assay for translational repression and direct demonstration of the iron switch. *Eur J Biochem* **218**: 657-667

- Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD (1999a) An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5616-5621
- Gray TA, Smithwick MJ, Schaldach MA, Martone DL, Graves JA, McCarrey JR, Nicholls RD (1999b) Concerted regulation and molecular evolution of the duplicated SNRPB'/B and SNRPN loci. *Nucleic Acids Res* **27**: 4577-4584
- Greally JM, Starr DJ, Hwang S, Song L, Jaarola M, Zemel S (1998) The mouse H19 locus mediates a transition between imprinted and non-imprinted DNA replication patterns. *Hum Mol Genet* **7**: 91-95
- Gregory RI, Randall TE, Johnson CA, Khosla S, Hatada I, O'Neill LP, Turner BM, Feil R (2001) DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. *Mol Cell Biol* **21**: 5426-5436
- Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* **20**: 1709-1714
- Haig D (1997) Parental antagonism, relatedness asymmetries, and genomic imprinting. *Proc Biol Sci* **264**: 1657-1662
- Hall JG (1990) Genomic imprinting. *Arch Dis Child* **65**: 1013-1015
- Hamabe J, Kuroki Y, Imaizumi K, Sugimoto T, Fukushima Y, Yamaguchi A, Izumikawa Y, Niikawa N (1991) DNA deletion and its parental origin in Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* **41**: 64-68
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**: 486-489
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**: 1983-1993
- Hendrich B, Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**: 6538-6547
- Henry I, Bonaiti-Pellie C, Chehensse V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, Junien C (1991) Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* **351**: 665-667
- Herzing LB, Kim SJ, Cook EH, Jr., Ledbetter DH (2001) The human aminophospholipid-transporting ATPase gene *ATP10C* maps adjacent to *UBE3A* and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* **68**: 1501-1505
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* **104**: 829-838
- Ihle JN (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* **84**: 331-4

- Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc JL, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F (1997) The human necdin gene, *NDN*, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* **17**: 357-361
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080
- Jeppesen P, Turner BM (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* **74**: 281-289
- Ji Y, Walkowicz MJ, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD (1999) The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **8**: 533-542
- Jiang CL, Jin SG, Lee DH, Lan ZJ, Xu X, O'Connor TR, Szabo PE, Mann JR, Cooney AJ, Pfeifer GP (2002) MBD3L1 and MBD3L2, two new proteins homologous to the methyl-CpG-binding proteins MBD2 and MBD3: characterization of MBD3L1 as a testis-specific transcriptional repressor. *Genomics* **80**: 621-629
- Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL (1999) Genetics of Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **65**: 1-6
- Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD (1999) A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* **8**: 783-793
- Kamel A, Margery V, Norstedt G, Thoren M, Lindgren AC, Bronnegard M, Marcus C (1995) Growth hormone (GH) treatment up-regulates GH receptor mRNA levels in adipocytes from patients with GH deficiency and Prader-Willi syndrome. *Pediatr Res* **38**: 418-421
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**: 900-903
- Kantor B, Kaufman Y, Makedonski K, Razin A, Shemer R (2004a) Establishing the epigenetic status of the Prader-Willi/Angelman imprinting center in the gametes and embryo. *Hum Mol Genet* **13**: 2767-2779
- Kantor B, Makedonski K, Green-Finberg Y, Shemer R, Razin A (2004b) Control elements within the PWS/AS imprinting box and their function in the imprinting process. *Hum Mol Genet* **13**: 751-762
- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 70-73

- Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**: 1077-1088
- Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Simon I, Keshet I, Driscoll DJ, Nicholls RD, Cedar H (1993) Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* **364**: 459-463
- Knoll JH, Cheng SD, Lalande M (1994) Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nat Genet* **6**: 41-46
- Knoll JH, Glatt KA, Nicholls RD, Malcolm S, Lalande M (1991) Chromosome 15 uniparental disomy is not frequent in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **48**: 16-21
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Glatt K, Graham JM, Jr., Kaplan L, Lalande M (1990) Angelman syndrome: three molecular classes identified with chromosome 15q11q13-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* **47**: 149-154
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Jr., Lalande M, Latt SA (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* **32**: 285-290
- Kosiol C, Vinar T, da Fonseca RR, Hubisz MJ, Bustamante CD, Nielsen R, Siepel A (2008) Patterns of positive selection in six Mammalian genomes. *PLoS Genet* **4**: e1000144
- Kotzot D (2004) Maternal uniparental disomy 14 dissection of the phenotype with respect to rare autosomal recessively inherited traits, trisomy mosaicism, and genomic imprinting. *Ann Genet* **47**: 251-260
- Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, Mehes K, Hamel BC, Otten BJ, Hergersberg M, et al. (1995) Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* **4**: 583-587
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**:693-705
- Kozlov SV, Bogenpohl JW, Howell MP, Wevrick R, Panda S, Hogenesch JB, Muglia LJ, Van Gelder RN, Herzog ED, Stewart CL (2007) The imprinted gene *Magel2* regulates normal circadian output. *Nat Genet* **39**: 1266-1272
- Kruijver FP, Balesar R, Espila AM, Unmehopa UA, Swaab DF (2003) Estrogen-receptor-beta distribution in the human hypothalamus: similarities and differences with ER alpha distribution. *J Comp Neurol* **466**: 251-277
- Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M, Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G (2002) Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex. *Am J Med Genet* **110**: 268-272
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

- Lau JC, Hanel ML, Wevrick R (2004) Tissue-specific and imprinted epigenetic modifications of the human NDN gene. *Nucleic Acids Res* **32**: 3376-3382
- Lee PDK, Brannam CL, Hintz RL, Rosenfeld RG (1987) Growth hormone treatment of short stature in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol* **2**: 31-34.
- Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, Wevrick R (2000) Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* **9**: 1813-1819
- Leibold EA, Munro HN (1988) Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 2171-2175
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**: 662-673
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365
- Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC, 3rd, Lobanenko VV (2002) BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6806-6811
- MacDonald HR, Wevrick R (1997) The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* **6**: 1873-1878
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JA, Jeffreys AJ, Pembrey ME (1991) Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* **337**: 694-697
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- Mapendano CK, Kishino T, Miyazaki K, Kondo S, Yoshiura K, Hishikawa Y, Koji T, Niikawa N, Ohta T (2006) Expression of the Snurf-Snrpn IC transcript in the oocyte and its putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *J Hum Genet* **51**: 236-243
- Martin CC, McGowan R (1995) Genotype-specific modifiers of transgene methylation and expression in the zebrafish, *Danio rerio*. *Genet Res* **65**: 21-28
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Armour JA, Jeffreys AJ, Ladda RL, Nicholls RD (1992) The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med* **326**: 1599-1607



- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 74-77
- Maxwell ES, Fournier MJ (1995) The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem* **64**: 897-934
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**: 501-502
- McGrath J, Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**: 179-183
- Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K, Nakao M, Kondo I, Saitoh S, Oshimura M (2001) A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* **28**: 19-20
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**: 483-488
- Moore T, Haig D (1991) Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* **7**: 45-49
- Muckenthaler M, Gray NK, Hentze MW (1998) IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell* **2**: 383-388
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- Muscатели F, Abrous DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, Cau P, Cremer H (2000) Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**: 3101-3110
- Nachman MW, Crowell SL (2000) Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* **156**: 297-304
- Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* **13**: 2547-2555
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* **23**: 58-61
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M (1989) Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **342**: 281-285

- Nielsen R, Bustamante C, Clark AG, Glanowski S, Sackton TB, Hubisz MJ, Fledel-Alon A, Tanenbaum DM, Civello D, White TJ, J JS, Adams MD, Cargill M (2005) A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. *PLoS Biol* **3**: e170
- O'Carroll D, Scherthan H, Peters AH, Opravil S, Haynes AR, Laible G, Rea S, Schmid M, Lebersorger A, Jerratsch M, Sattler L, Mattei MG, Denny P, Brown SD, Schweizer D, Jenuwein T (2000) Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* **20**: 9423-9433
- Ohara O, Dorit RL, Gilbert W (1989) One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5673-5677
- Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD (1999a) Molecular mechanism of angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* **64**: 385-396
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD (1999b) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **64**: 397-413
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**: 475-478
- Ozcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* **2**: 265-269
- Paldi A, Gyapay G, Jami J (1995) Imprinted chromosomal regions of the human genome display sex-specific meiotic recombination frequencies. *Curr Biol* **5**: 1030-1035
- Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R (2002) The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *Embo J* **21**: 5807-5814
- Prader A, Labhart A, Willi H (1956) Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenschr* **86**: 1260-1261.
- Raca G, Buiting K, Das S (2004) Deletion analysis of the imprinting center region in patients with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome by real-time quantitative PCR. *Genet Test* **8**: 387-394
- Rainier S, Chai JH, Tokarz D, Nicholls RD, Fink JK (2003) NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet* **73**: 967-971

- Razin A, Kafri T (1994) DNA methylation from embryo to adult. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **48**: 53-81
- Reed JA, Wilkinson PA, Patel H, Simpson MA, Chatonnet A, Robay D, Patton MA, Crosby AH, Warner TT (2005) A novel NIPA1 mutation associated with a pure form of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics* **6**: 79-84
- Reik W (1989) Genomic imprinting and genetic disorders in man. *Trends Genet* **5**: 331-336
- Reik W, Constancia M (1997) Genomic imprinting. Making sense or antisense? *Nature* **389**: 669-671
- Reik W, Maher ER (1997) Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* **13**: 330-334
- Reik W, Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**: 21-32
- Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalande M, Gillessen-Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B (1994) Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* **54**: 741-747
- Robinson WP, Lalande M (1995) Sex-specific meiotic recombination in the Prader-Willi/Angelman syndrome imprinted region. *Hum Mol Genet* **4**: 801-806
- Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaux L, Lalande M (1998) An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* **19**: 15-16
- Rougeulle C, Glatt H, Lalande M (1997) The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat Genet* **17**: 14-15
- Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K (2001) The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* **10**: 2687-2700
- Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K (2004) SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* **114**: 553-561
- Runte M, Varon R, Horn D, Horsthemke B, Buiting K (2005) Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster HBII-52 from a major role in Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* **116**: 228-230
- Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL (2008) Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* **40**: 719-721

- Saitoh S, Buiting K, Cassidy SB, Conroy JM, Driscoll DJ, Gabriel JM, Gillesen-Kaesbach G, Glenn CC, Greenswag LR, Horsthemke B, Kondo I, Kuwajima K, Niikawa N, Rogan PK, Schwartz S, Seip J, Williams CA, Nicholls RD (1997) Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet* **68**: 195-206
- Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, Buxton JL, Driscoll DJ, Arnemann J, Konig R, Malcolm S, Horsthemke B, Nicholls RD (1996) Minimal definition of the imprinting center and fixation of chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7811-7815
- Saitoh S, Harada N, Jinno Y, Hashimoto K, Imaizumi K, Kuroki Y, Fukushima Y, Sugimoto T, Renedo M, Wagstaff J, et al. (1994) Molecular and clinical study of 61 Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* **52**: 158-163
- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**: 81-83
- Schuffenhauer S, Buchholz T, Stengel-Rutkowski S, Buiting K, Schmidt H, Meitinger T (1996) A familial deletion in the Prader-Willi syndrome region including the imprinting control region. *Hum Mutat* **8**: 288-292
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wolgemuth DJ (2004) Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* **4**: 513-519
- Shemer R, Hershko AY, Perk J, Mostoslavsky R, Tsuberi B, Cedar H, Buiting K, Razin A (2000) The imprinting box of the Prader-Willi/Angelman syndrome domain. *Nat Genet* **26**: 440-443
- Simon I, Tenzen T, Reubinoff BE, Hillman D, McCarrey JR, Cedar H (1999) Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* **401**: 929-932
- Skryabin BV, Gubar LV, Seeger B, Pfeiffer J, Handel S, Robeck T, Karpova E, Rozhdestvensky TS, Brosius J (2007) Deletion of the MBII-85 snoRNA gene cluster in mice results in postnatal growth retardation. *PLoS Genet* **3**: e235
- Slatter RE, Elliott M, Welham K, Carrera M, Schofield PN, Barton DE, Maher ER (1994) Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* **31**: 749-753
- Smith CM, Steitz JA (1998) Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol* **18**: 6897-6909
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517

- Spiess AN, Feig C, Schulze W, Chalmel F, Cappallo-Obermann H, Primig M, Kirchhoff C (2007) Cross-platform gene expression signature of human spermatogenic failure reveals inflammatory-like response. *Hum Reprod* **22**: 2936-2946
- Spritz RA, Bailin T, Nicholls RD, Lee ST, Park SK, Mascari MJ, Butler MG (1997) Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. *Am J Med Genet* **71**: 57-62
- Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**: 548-550
- Sutcliffe JS, Jiang YH, Galijaard RJ, Matsuura T, Fang P, Kubota T, Christian SL, Bressler J, Cattanach B, Ledbetter DH, Beaudet AL (1997) The E6-Ap ubiquitin-protein ligase (UBE3A) gene is localized within a narrowed Angelman syndrome critical region. *Genome Res* **7**: 368-377
- Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Orstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, Beaudet AL (1994) Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* **8**: 52-58
- Swaab DF (1997) Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Paediatr Suppl* **423**: 50-54
- Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3740-3745
- Tauber M, Barbeau C, Jouret B, Pienkowski C, Malzac P, Moncla A, Rochiccioli P (2000) Auxological and endocrine evolution of 28 children with Prader-Willi syndrome: effect of GH therapy in 14 children. *Horm Res* **53**: 279-287
- Temple IK, James RS, Crolla JA, Sitch FL, Jacobs PA, Howell WM, Betts P, Baum JD, Shield JP (1995) An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat Genet* **9**: 110-112
- Tycowski KT, Shu MD, Steitz JA (1993) A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3. *Genes Dev* **7**: 1176-1190
- Uetsuki T, Takagi K, Sugiura H, Yoshikawa K (1996) Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J Biol Chem* **271**: 918-924
- Voight BF, Kudaravalli S, Wen X, Pritchard JK (2006) A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol* **4**: e72
- Vu TH, Hoffman AR (1997) Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet* **17**: 12-13
- Weber JL, Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* **2**: 1123-1128

- Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**: R61-68
- Wevrick R, Kerns JA, Francke U (1994) Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* **3**: 1877-1882
- Wey E, Bartholdi D, Riegel M, Nazlican H, Horsthemke B, Schinzel A, Baumer A (2005) Mosaic imprinting defect in a patient with an almost typical expression of the Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* **13**: 273-277
- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, et al. (1995) Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* **56**: 237-238
- Williamson SH, Hubisz MJ, Clark AG, Payseur BA, Bustamante CD, Nielsen R (2007) Localizing recent adaptive evolution in the human genome. *PLoS Genet* **3**: e90
- Wirth J, Back E, Huttenhofer A, Nothwang HG, Lich C, Gross S, Menzel C, Schinzel A, Kioschis P, Tommerup N, Ropers HH, Horsthemke B, Buiting K (2001) A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* **10**: 201-210
- Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T (2003) Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet* **12**: 837-847
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* **5**: 73-83
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997a) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet* **5**: 94-98
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W (1997b) Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet* **6**: 387-395

## 7. Anhang

### 7.1 Oligonukleotide (Primer)

Primer für die *Exon-Connection*-PCR des *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptes zwischen *PWRN1* und dem vorletzten telomerischen Exon von DB525036

SNRPN_Exon23	5'-TCCTAACAACCACTATAAGCTTGG-3'
SNRPN_4_rw	5'-GATGCTTCACGGTTTTTCACA-3'

Primer für die *Exon-Connection*-PCR des *IC-SNURF-SNRPN*-Transkriptes zwischen dem vorletzten telomerischen Exon von DB525036 und dem upstream Exon von *U5*

SNRPN_4_fw	5'-CCCACAAGTAGGGTTGACCA-3'
SNRPN_U5	5'-CAGATTCTTCTGCCGCAAAC-3'

Primer für die Genotypisierung des SNPs rs12908526 in Exon 26 von *PWRN1*

EX26SNPF	5'-GGAACAAGTTTATTACACACAGAGA-3'
EX26SNPR	5'-TGTCAACAGGGAAAGTGGAA-3'

Primer zur Amplifikation der mRNA BC035402

BC035402_fw1	5'-TTAACCTGCGTTTTCCCGTA-3'
BC04ex_rw	5'-AAACACAACACCCCAAGCAT-3'
BC04exnest_rw	5'-TGTTGCAAGGAACGAGACTG-3'

Primer für die 5'RACE zur Verlängerung von BC035402 in 5'-Richtung

SPI	5'-TCTTGCTGACACCATTCTGC-3'
SPII	5'-TCTTCACACCACCCTCTGTG-3'
SPIII	5'-TAACCTGCGTTTTCCCGTAAA-3'

Primer für die Methylierungsanalyse des CpG40

nCpG1_fw	5'-TTGTAGGAAGGTTATATGATAGAGGG-3'
nCpG1-rw	5'-AACATAATAAAAAACCTAAAAAAA-3'

## Primer für die Methylierungsanalyse des CpG30

nCpG2\_fw 5'-AAATAGTAGGGGGAAAGGGTAATAT-3'

nCpG2-rw 5'-TAAATCCTCCAACCTCACAAAAC-3'

## Primer für die Methylierungsanalyse des CpG37

nCpG3\_fw 5'-GGGTTTTATTGTTATTTATATGGTTATTAT-3'

nCpG3-rw 5'-CCAACCTATCAAATAACCTTCCC-3'

Primer für die Methylierungsanalyse im 5'UTR von *C15orf2*

c15orf2methF2 5'-AGGTTGTTTTGTGTTTAATTTGAAG-3'

c15orf2methR2 5'-CTCTACCTATTCCTTAACCCTAACC-3'

Primer für die Methylierungsanalyse der Region stromabwärts des Start-Codons von *C15orf2*

C15orf2cpgF 5'-TGGGTAATTTATTTAGTAAATTTAGATT-3'

C15orf2cpgR 5'-TCCTAATAACCAACCCCCAAC-3'

Primer für die Fragmentlängenanalyse des STRs nt4099 in *C15orf2* (AF179681)

plen47 5'-TAGGGAGAAACCTCTAGTCTC-3'

pGTR2 (FAM) 5'-CTGGGCTAAGGCTCCGTC-3'

Primer für die Fragmentlängenanalyse des STRs nt4726 in *C15orf2* (AF179681)

plen49c (FAM) 5'-TTAACCTGCTCTCTTCCTAC-3'

plen49cr 5'-GTTCTGACTGGGCTCATC-3'

Primer für die Fragmentlängenanalyse des STRs nt5508 in *C15orf2* (AF179681)

plen56b (FAM) 5'-TATACATAGGGATGGATAGAC-3'

plen56br 5'-CTCACCTCCTAATACCATC-3'

Primer für die Fragmentlängenanalyse des STRs nt5898 in *C15orf2* (AF179681)

pc313b 5'-ATGTTGTTTAAGCTACCAGTC-3'

pc314r (FAM) 5'-GCACCATTCCTAAGGAA-3'



Primer für die RT-PCR-Analyse des codierenden Bereichs von *C15orf2*

pEN2c	5'-AGCCTGATCCGGATGCA-3'
pen2mr	5'-AATACAGAAAGGCTTCTCATC-3'

Primer für die RT-PCR-Analyse des 3'UTRs von *C15orf2*

pGTR2	5'-CTGGGCTAAGGCTCCGTC-3'
plen47	5'-TAGGGAGAAACCTCTAGTCTC-3'

Primer für die RT-PCR-Analyse des  $\beta$ -Actin-Gens

$\beta$ -Actin-F	5'-TTGCTAT-CCAGGCTGTGCTATCCC-3'
$\beta$ -Actin-R	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

Primer für Sonden für *in situ*-Hybridisierung der *C15orf2*-mRNA

C15orf2_S4_fwII	5'-CATGGAATTCTCTCCTTCAGTCCAGCCACT-3'
C15orf2_S4_Rii	5'-CATGGAATTCGGGTAGGTGGGTCTAAACCAG-3'

## 7.2 Sonden für die SNP-Genotypisierung durch TaqMan Genotyping Assays (Applied Biosystems)

rs3784246	Assay-ID: C__22274534_10
rs1563102	Assay-ID: C__7515437_10
rs3742950	Assay-ID: C__1796102_1_

### 7.3 Rohdaten der *C15orf2*-Haplotypanalyse

**Tabelle 7.1: *C15orf2* SNP- und STR-Haplotypen von 182 PWS- und AS-Deletionspatienten**

Patient	SNP			Anzahl der Wiederholungen des STR nt4099					Anzahl der Wiederholungen des STR nt5898			
	rs3784246	rs1563102	rs3742950	5x	6x	7x	8x	9x	7x	8x	11x	12x
1	C	G	G				X					X
2	C	G	G				X				X	
3	C	G	G				X				X	
4	C	G	G				X				X	
5	C	G	G				X				X	
6	C	G	G				X				X	
7	C	G	G				X				X	
8	C	G	G				X				X	
9	C	G	G				X				X	
10	C	G	G				X				X	
11	C	G	G				X				X	
12	T	G	G				X					X
13	T	G	G		X					X		
14	T	G	G		X					X		
15	T	G	G		X				X			
16	T	G	G		X				X			
17	T	G	G		X				X			
18	T	G	G	X								X
19	T	G	G	X								X
20	T	G	G	X								X
21	T	G	G	X								X
22	T	G	G	X								X
23	T	G	G	X								X
24	T	G	G	X								X
25	T	G	G	X								X
26	T	G	G	X							X	
27	T	G	G	X							X	
28	T	G	G	X							X	
29	T	G	G	X							X	
30	T	G	G	X							X	
31	T	G	G	X							X	
32	T	G	G	X							X	
33	T	G	G	X							X	
34	T	G	G	X							X	
35	T	G	G	X							X	
36	T	G	G	X							X	
37	T	G	G				X		X			
38	T	G	G				X		X			
39	T	G	G				X		X			
40	T	G	G				X		X			
41	T	G	G				X		X			
42	T	G	G				X		X			

43	T	G	G				X		X			
44	T	G	G				X		X			
45	T	G	C				X		X			
46	T	G	C				X		X			
47	T	G	C				X		X			
48	T	G	C				X		X			
49	T	G	C				X		X			
50	T	G	C				X		X			
51	T	G	C				X		X			
52	T	G	C				X		X			
53	T	G	C				X		X			
54	T	G	C				X		X			
55	T	G	C				X		X			
56	T	G	C				X		X			
57	T	G	C				X		X			
58	T	G	C				X		X			
59	T	G	C				X		X			
60	T	G	C				X		X			
61	T	G	C				X		X			
62	T	G	C				X		X			
63	T	G	C				X		X			
64	T	G	C				X		X			
65	T	G	C				X		X			
66	T	G	C				X		X			
67	T	G	C				X		X			
68	T	G	C				X		X			
69	T	G	C				X		X			
70	T	G	C				X		X			
71	T	G	C				X		X			
72	T	G	C				X		X			
73	T	G	C				X		X			
74	T	G	C				X		X			
75	T	G	C				X		X			
76	T	G	C				X		X			
77	T	G	C				X		X			
78	T	G	C				X		X			
79	T	G	C				X		X			
80	T	G	C				X		X			
81	T	G	C				X		X			
82	T	G	C				X		X			
83	T	G	C				X		X			
84	T	G	C				X		X			
85	T	G	C				X		X			
86	T	G	C				X		X			
87	T	G	C				X		X			
88	T	G	C				X		X			
89	T	G	C				X		X			
90	T	G	C				X		X			
91	T	G	C				X		X			
92	T	G	C				X		X			
93	T	G	C				X		X			
94	T	G	C				X		X			
95	T	G	C				X		X			

96	T	G	C				X		X			
97	T	G	C				X		X			
98	T	G	C				X		X			
99	T	G	C				X		X			
100	T	G	C				X		X			
101	T	G	C				X		X			
102	T	G	C				X		X			
103	T	G	C				X		X			
104	T	G	C				X		X			
105	T	G	C				X		X			
106	T	G	C				X		X			
107	T	G	C				X		X			
108	T	G	C				X		X			
109	T	G	C				X		X			
110	T	G	C				X		X			
111	T	G	C				X		X			
112	T	G	C				X		X			
113	T	G	C				X		X			
114	T	G	C				X		X			
115	T	G	C				X		X			
116	T	G	C				X		X			
117	T	G	C				X		X			
118	T	G	C			X			X			
119	T	G	C			X			X			
120	T	G	C			X			X			
121	T	G	C					X	X			
122	T	G	C					X	X			
123	T	G	C					X	X			
124	T	C	C			X			X			
125	T	C	C			X			X			
126	T	C	C			X			X			
127	T	C	C			X			X			
128	T	C	C			X			X			
129	T	C	C			X			X			
130	T	C	C			X			X			
131	T	C	C			X			X			
132	T	C	C			X			X			
133	T	C	C			X			X			
134	T	C	C			X			X			
135	T	C	C			X			X			
136	T	C	C				X			X		
137	T	C	C				X			X		
138	T	C	C		X				X			
139	T	C	C		X				X			
140	T	C	C		X				X			
141	T	C	C		X				X			
142	T	C	C		X				X			
143	T	C	C		X				X			
144	T	C	C		X				X			
145	T	C	C		X				X			
146	T	C	C		X				X			
147	T	C	C		X				X			
148	T	C	C		X				X			

149	T	C	C		X				X			
150	T	C	C		X				X			
151	T	C	C		X				X			
152	T	C	C			X				X		
153	T	C	C			X				X		
154	T	C	C					X	X			
155	T	C	C					X	X			
156	T	C	C					X	X			
157	T	C	C					X	X			
158	T	C	C				X		X			
159	T	C	C				X		X			
160	T	C	C				X		X			
161	T	C	C				X		X			
162	T	C	C				X		X			
163	T	C	C				X		X			
164	T	C	C				X		X			
165	T	C	C				X		X			
166	T	C	C				X		X			
167	T	C	C				X		X			
168	T	C	C				X		X			
169	T	C	C				X		X			
170	T	C	C				X		X			
171	T	C	C				X		X			
172	T	C	C				X		X			
173	T	C	C				X		X			
174	T	C	C				X		X			
175	T	C	C				X		X			
176	T	C	C				X		X			
177	T	C	C				X		X			
178	T	C	C				X		X			
179	T	C	C				X		X			
180	T	C	C				X		X			
181	T	C	C				X		X			
182	T	C	C				X		X			

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mir auf unterschiedliche Weise bei meiner Doktorarbeit geholfen haben. Ich danke insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die wertvollen Ideen und Anregungen zum Verlauf der Arbeit.

Frau Dr. Karin Buiting für ihre große Hilfsbereitschaft, für die vielen Ratschläge und wissenschaftlichen Diskussionen, für ihre Fähigkeit immer den Überblick zu bewahren und für ihre unendliche Geduld – all dies hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen

Frau Unga Unmehopa und Herrn Dr. Dick Swaab vom Institut für Neurowissenschaften, Academy of Arts and Science, Amsterdam, für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern kollaborierender Institute, die in vielfältiger Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Frank Kaiser für seine vielen guten Ideen und Ratschläge.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für eine schöne Arbeitsatmosphäre und für eine gute Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen ehemaligen Labornachbarinnen Stephanie Groß und Christina Lich für die technische Unterstützung bedanken. Ebenfalls möchte ich mich ganz besonders bei Nicholas Wagner und Tobias Schopen für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die immer offenen Ohren und die Aufheiterung des Laboralltags bedanken.

Meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Meinen Freunden, auf die man sich wirklich immer verlassen kann.

## Lebenslauf

Name	<b>Michaela Wawrzik</b>
Anschrift	Wiesenstr. 17 58452 Witten
Geburtsdatum	14.06.1981
Geburtsort	Witten
Familienstand	ledig
Schulausbildung	<u>1987 - 1991</u> <b>Grundschule</b> , Witten <u>1991 - 2000</u> <b>Ruhr-Gymnasium</b> , Witten <i>Abschluss: Abitur</i>
Studium	<u>Oktober 2000 – April 2005</u> <b>Studium der Biologie</b> an der Ruhr-Universität Bochum <i>Abschluss: Diplom</i>
Studienbegleitende Tätigkeiten	<u>Jan. 2004 – Sept. 2004</u> <b>Studentische Hilfskraft</b> am Lehrstuhl für Zellmorphologie der Ruhr-Universität Bochum
Promotion	<u>Juli 2005 – März 2006</u> <b>Promotion im Fach Biologie</b> im Institut für Zellbiologie der Ruhr-Universität Bochum, gefördert durch die International Graduate School of Neuroscience (IGSN)  <u>seit April 2006</u> <b>Promotion im Fach Biologie</b> im Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

Witten, Oktober 2009

(Michaela Wawrzik)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Expressionsanalysen geprägter Gene in der Prader-Willi/Angelman-Syndrom-Region“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Michaela Wawrzik befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers  
/Mitglied der Universität Duisburg-Essen  
(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin  
(Michaela Wawrzik)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin  
(Michaela Wawrzik)